



Luís Miguel Dias Martins

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Produção e caracterização de uma matriz dérmica à base de nanofibras de gelatina e policaprolactona

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Dr. Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, FCT-UNL
Co-orientadores: Dra. Célia Reis Henriques, Professor Auxiliar, FCT-UNL
Dr. João Paulo Borges, Professor Auxiliar, FCT-UNL
Dra. Maria Angélica Roberto, Médica, CHLC

JÚRI

Presidente: Dra. Maria Adelaide Jesus, Professora Catedrática, FCT-UNL
Vogais: Dr. Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, FCT-UNL
Dra. Célia Reis Henriques, Professor Auxiliar, FCT-UNL
Dra. Ana Maria Ramos, Professora Associada, FCT-UNL (Arguente)

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Produção e caracterização de uma matriz dérmica à base de nanofibras de gelatina e policaprolactona

Luís Miguel Dias Martins

Orientador: Jorge Carvalho Silva

Co-orientador: Célia Reis Henriques

Co-orientador: João Paulo Borges

Co-orientador: Maria Angélica Roberto

Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

Departamento de Física

Outubro de 2012

Direitos de Cópia

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

"A grande sabedoria, penso eu, é ter um sentido relativizado de tudo. Não dramatizar nada."

José Saramago

Agradecimentos

No decorrer desta etapa académica foram várias as pessoas que, directa ou indirectamente, me fizeram crescer como estudante, investigador e como pessoa. A essas pessoas, o meu mais sincero obrigado.

Existem contudo vários elementos cujo contributo foi indispensável e merece destaque. Quero então agradecer em particular:

Aos meus orientadores, Professor Jorge Carvalho Silva e Professora Célia Henriques, do Grupo de Engenharia de Tecidos (GREAT) do Departamento de Física, por me terem aceite como orientando e por todo o tempo dispensado, ajuda, dedicação e acompanhamento científico ao longo deste trabalho. Sem eles a realização deste trabalho não teria sido possível.

Ao meu co-orientador, Professor João Paulo Borges, do Departamento de Ciência dos Materiais, por me ter permitido o acesso "fora de horas" à máquina de tracção e pela sua disponibilidade na medição do comportamento reológico das soluções usadas.

À minha co-orientadora, Doutora Maria Angélica Roberto, pela supervisão dos ensaios *in vivo* que tive o prazer de acompanhar e pela oportunidade de participar no workshop: *Essential Microsurgical techniques in Laboratory Animals*.

À Mestre Susana Gomes, pela sua disponibilidade, especialmente na fase inicial deste trabalho e durante os ensaios *in vivo*.

Aos meus colegas e amigos de trabalho no GREAT, Ana Rita Rosa, Ana Claudia Aragão e Ana Sara Costa.

A todos os meus colegas biomédicos, em especial à Barbara Oliveira, Alexandra Teles e Carlos Marques, por todos os momentos de estudo e diversão ao longo do curso.

À minha avó, que sempre me deu força para lutar pelos meus objectivos e concluir os meus estudos.

Aos meus pais e irmã, a quem devo tudo o que sou hoje e que sempre me apoiaram durante este longo percurso académico.

Resumo

Quando a pele sofre uma lesão na sua estrutura que envolva um grau de destruição da derme elevado, este órgão não consegue reparar adequadamente o tecido afectado, dando origem a defeitos anatómicos, funcionais e estéticos. O tratamento destas lesões com substitutos de pele tem melhorado os resultados clínicos obtidos, mas há ainda muito a melhorar nas terapias actuais. Neste trabalho foram desenvolvidas matrizes porosas destinadas a constituir a componente dérmica de um substituto temporário de pele. Para tal, recorreu-se à técnica de electrofiação e a polímeros biocompatíveis e biodegradáveis – a gelatina e a policaprolactona – para produzir várias matrizes, de composição variável, que posteriormente foram reticuladas e caracterizadas de modo a avaliar o seu potencial em promover a regeneração da derme. Esta caracterização foi feita através da análise morfológica das matrizes por SEM, da medição do seu ângulo de contacto, da análise da sua composição química por FTIR-ATR e da avaliação das suas propriedades mecânicas através de ensaios de tracção. A análise morfológica das matrizes revelou que o processo de reticulação não afecta significativamente as fibras, originando matrizes com porosidades elevadas. A medição dos ângulos de contacto permitiu concluir que a maioria das matrizes possui uma hidrofilicidade ideal para a posterior adesão à pele. A análise FTIR- ATR confirmou a presença de ambos os polímeros nas matrizes e que o processo de reticulação não provoca alterações a nível da sua composição química. Os ensaios de tracção permitiram observar que o aumento da quantidade de gelatina nas matrizes provoca um aumento da rigidez da matriz seca.

Palavras Chave: Pele; Electrofiação; Policaprolactona; Gelatina de Peixe de Água Fria; Substituto Dérmico

Abstract

When a skin lesion involves severe dermis destruction, this organ isn't able to adequately repair the damaged tissue, yielding anatomic, functional and esthetic defects. The treatment of these lesions with skin substitutes has improved the clinical outcome, but there is still a lot to improve in current therapies. In this work, porous scaffolds were developed with the purpose of performing as the dermal component of a temporary skin substitute. For this purpose, the electrospinning technique was used together with biocompatible and biodegradable polymers – gelatin and polycaprolactone – in order to obtain several scaffolds, with different proportions, that were later cross-linked and characterized in order to assess their potential to promote the dermis regeneration. This characterization was obtained through the morphological analysis of the scaffolds by SEM, the measurement of their contact angle, the analysis of their chemical composition by FTIR-ATR, and the assessment of their mechanical properties through tensile tests. The morphological analysis of the scaffolds revealed that the cross-link process does not significantly affect the fibers, yielding highly porous scaffolds. From the contact angle measurements, it was concluded that the majority of the scaffolds possess an ideal hydrophilicity for skin adhesion. FTIR-ATR analysis confirmed the presence of both polymers in the scaffolds and that the cross-linking process doesn't change its chemical composition. Tensile tests showed that an increase in the amount of gelatin in the scaffolds causes an increase in the rigidity of the dry scaffold.

Keywords: Skin, Electrospinning, Polycaprolactone, Cold Water Fish Gelatin, Dermal Substitute

Lista de símbolos

A lista que segue contém os símbolos usados ao longo desta dissertação.

F	Força
Δl	Alongamento
σ	Tensão
ϵ	Deformação
ρ	Densidade
A	Área secção recta
l_0	Comprimento inicial
E	Módulo de Young

LISTA DE SÍMBOLOS

Lista de acrónimos

A lista que segue contém as abreviaturas e acrónimos usados ao longo desta dissertação.

ATR	Reflexão Total Atenuada (do inglês, <i>Attenuated Total Reflectance</i>)
BSE	Encefalopatia Espongiforme Bovina (do inglês, <i>Bovine Spongiform Encephalopathy</i>)
CENIMAT/I3N	Centro de Investigação de Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
ECM	Matriz extra celular (do inglês, <i>Extracellular matrix</i>)
FIB	Feixe de Iões Focalizado (do inglês, <i>Focused ion beam</i>)
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
Gel	Gelatina
GREAT	Grupo de Engenharia de Tecidos da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
GTA	Glutaraldeído
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, <i>Human immunodeficiency virus</i>)
PCL	Policaprolactona
PGA	Poli Ácido Glicólico (do inglês, <i>Poly(glycolic acid)</i>)
PLA	Poli Ácido Lático (do inglês, <i>Poly(lactic acid)</i>)
PLGA	Poli Ácido (Lático-co-Glicólico) (do inglês, <i>Poly(lactic-co-glycolic acid)</i>)
PVP	Polivinilpirrolidona
RGD	Arginina-Glicina-Ácido aspártico (Códigos a uma letra dos aminoácidos)
RPM	Rotações por Minuto
SEM	Microscopia Electrónica de Varrimento (do inglês, <i>Scanning Electronic Microscopy</i>)

LISTA DE ACRÓNIMOS

Conteúdo

Agradecimentos	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
Lista de símbolos	xv
Lista de acrónimos	xvii
Conteúdo	xix
Lista de figuras	xxi
Lista de tabelas	xxiii
1 Introdução	1
1.1 Contextualização	1
1.2 A pele	3
1.3 Engenharia de tecidos e o fabrico de matrizes	4
1.4 Substitutos dérmicos	5
1.4.1 Alloderm®	5
1.4.2 Integra Dermal Regeneration Template®	6
1.4.3 Matriderm®	7
1.5 Produção de uma matriz dérmica	8
1.6 Electrofiação	8
1.7 Materiais	10
1.7.1 Policaprolactona	10
1.7.2 Gelatina	10
1.7.3 Combinação PCL/gelatina	11
2 Materiais e métodos	15
2.1 Soluções	15
2.1.1 Preparação das soluções	15

2.1.2	Caracterização das soluções	16
2.1.2.1	Condutividade	16
2.1.2.2	Tensão superficial	18
2.1.2.3	Viscosidade	19
2.2	Produção das matrizes	20
2.2.1	Montagem experimental	20
2.2.2	Electrofiação	21
2.2.3	Reticulação	22
2.3	Caracterização das matrizes	23
2.3.1	Ensaio de tracção	23
2.3.2	Análise morfológica	25
2.3.3	Ângulo de contacto	25
2.3.4	FTIR-ATR	27
2.3.5	Porosidade	28
3	Apresentação e discussão de resultados	29
3.1	Obtenção dos parâmetros de produção	29
3.1.1	Matrizes PCL:Gelatina	29
3.1.2	Matriz híbrida PCL+gelatina	31
3.2	Caracterização das soluções	36
3.2.1	Condutividade e Tensão Superficial	36
3.2.2	Reologia	37
3.3	Caracterização das matrizes	39
3.3.1	Morfologia	39
3.3.1.1	Antes da reticulação	39
3.3.1.2	Após a reticulação	44
3.3.1.3	Após a lavagem	47
3.3.2	Porosidade	50
3.3.3	Ensaio de tracção	50
3.3.4	Ângulo de contacto	54
3.3.5	FTIR-ATR	55
4	Conclusões e perspectivas	61
	Bibliografia	65
	Apêndice - Acompanhamento dos ensaios <i>in vivo</i>	I

Lista de Figuras

1.1	Esquema das três camadas da pele	3
1.2	Substitutos dérmicos - Aspecto dos substitutos	7
1.3	Montagem experimental da técnica de electrofiação	9
1.4	Polimerização da policaprolactona a partir da ϵ -caprolactona	10
2.1	Aspecto final das soluções PCL:Gelatina	17
2.2	Aparelho de medição da condutividade utilizado	17
2.3	Sistema de medição da tensão superficial	18
2.4	Reómetro rotacional	19
2.5	Montagem experimental para a produção das matrizes PCL:Gelatina	20
2.6	Montagem experimental para a produção da matriz híbrida	21
2.7	Disposição das lamelas na deposição da matriz híbrida	22
2.8	Aspecto das matrizes	23
2.9	Ensaio de tracção	24
2.10	Equipamento SEM Auriga Crossbeam (FIB-SEM)	26
2.11	Software Cam100 durante uma medição	26
2.12	Aparelho FTIR com módulo ATR acoplado	27
2.13	Tecnologia ATR	28
3.1	Exemplo de defeitos nas deposições da solução S10:90	30
3.2	Imagens das deposições com os parâmetros escolhidos	31
3.3	Imagens das deposições de PCL a 20% e de gelatina a 20%	32
3.4	Imagens das deposições de PCL a 23%	33
3.5	Imagens das deposições de gelatina a 23%	33
3.6	Imagens das deposições de PCL a 18%	34
3.7	Imagens das deposições de gelatina a 21%	34
3.8	Aspecto final da matriz híbrida	35
3.9	Representação da condutividade em função da proporção de gelatina	36
3.10	Comportamento reológico das soluções usadas	37
3.11	Comportamento reológico da solução S50:50 com e sem ultrasons	38
3.12	Imagens de SEM das matrizes PCL:Gelatina (antes da reticulação)	40

3.13	Histogramas dos diâmetros das fibras que compõem as matrizes PCL:Gelatina (antes da reticulação)	41
3.14	Imagens de SEM da matriz M1+1 e dos 2 tipos de fibras que a compõem (antes da reticulação)	42
3.15	Histogramas dos diâmetros das fibras da matriz M1+1 e dos 2 tipos de fibras que a compõem (antes da reticulação)	43
3.16	Imagens de SEM das matrizes (após a reticulação)	44
3.17	Histogramas dos diâmetros das fibras que compõem as matrizes (após a reticulação)	46
3.18	Imagens de SEM das matrizes (após lavagem)	47
3.19	Histogramas dos diâmetros das fibras que compõem as matrizes (lavadas) . .	49
3.20	Gráficos de tensão versus deformação das matrizes	53
3.21	Gotas sobre matriz M90:10	54
3.22	Gráfico ângulo versus tempo para uma gota de água colocada sobre a matriz M10:90	55
3.23	Espectro FTIR do PCL	55
3.24	Espectro FTIR da gelatina e da gelatina reticulada	57
3.25	Espectro FTIR de todas as matrizes	58
3.26	Espectro FTIR da matriz M50:50 e da matriz M1+1	59
1	Matrizes após a sua aplicação <i>in vivo</i>	II

Lista de Tabelas

2.1	Composição das soluções	16
2.2	Velocidade do ensaio consoante o tipo de matriz	24
3.1	Valores obtidos para a condutividade, densidade e tensão superficial	36
3.2	Valores obtidos para o diâmetro médio das fibras das matrizes PCL:Gelatina	39
3.3	Valores obtidos para o diâmetro médio das fibras matriz M1+1 e das fibras que a compõem	43
3.4	Valores obtidos para o diâmetro médio das fibras das matrizes	45
3.5	Valores obtidos para o diâmetro médio das fibras das matrizes (lavadas)	48
3.6	Valores obtidos para a porosidade das matrizes	50
3.7	Propriedades mecânicas das matrizes	51
3.8	Valores dos picos do espectro do PCL	56
3.9	Valores dos picos do espectro da gelatina	57

1

Introdução

1.1 Contextualização

A pele é o maior órgão do corpo humano, abrangendo uma área total de aproximadamente 2m^2 [1]. Tem como principais funções a regulação da temperatura e hidratação corporal, actuando ainda como barreira protectora contra as agressões exteriores. Como tal, qualquer lesão na sua estrutura deve ser reparada o mais rápido e eficientemente possível. Normalmente tem a capacidade, através de mecanismos próprios, de se regenerar de danos cuja extensão seja apenas ao nível da epiderme ou da parte mais superficial da derme. Contudo, no caso de queimaduras profundas, em que está envolvido um grau de destruição da derme elevado, este órgão não consegue reparar adequadamente o tecido afectado (uma vez que, com a excepção do rebordo da ferida, deixa de existir fonte de células que permita a regeneração [2]) dando origem a defeitos, não só a nível estético, mas também a nível funcional. Esta situação pode, em alguns casos mais graves, levar à morte do paciente [2]. As queimaduras graves estão entre os ferimentos físicos mais complexos de tratar, uma vez que além de deixar o paciente com cicatrizes visíveis deixam também sequelas psicológicas difíceis de ultrapassar.

Actualmente, os auto-enxertos são os melhores substitutos para tratar estes casos. Todavia, essa técnica nem sempre pode ser utilizada, particularmente em grandes áreas de superfície queimada, uma vez que nesses casos raramente está disponível uma quantidade suficiente de pele para fazer um auto-enxerto e este procedimento implica a criação de novas feridas. Existem substitutos que podem ser usados temporariamente para a cobertura da

ferida, como é o caso dos aloenxertos e dos xenoenxertos ¹. Porém, estas soluções apresentam problemas, como a rejeição do enxerto, implicações éticas e culturais e a possibilidade da transmissão de doenças [3]. Torna-se assim necessário encontrar uma alternativa que contorne estas condicionantes, uma vez que a partir do momento em que ocorre uma lesão é vital fornecer à pele uma estrutura que mimetize a função de barreira da epiderme, até que existam condições para que esta seja regenerada. Contudo, a aplicação de tal estrutura isoladamente acaba muitas vezes por não ser suficiente para evitar a contracção excessiva da lesão². Uma solução para ultrapassar esse problema é associar a essa estrutura uma matriz dérmica com as características físicas e químicas necessárias para guiar a migração e proliferação das células das zonas vizinhas da lesão para a mesma, até que a zona afectada tenha a capacidade de produzir e manter a sua própria matriz extra celular natural [4].

É neste contexto que se insere este trabalho, sendo o seu propósito desenvolver uma matriz porosa cujo destino será actuar como a componente dérmica de um substituto de pele. Este substituto encontra-se actualmente em desenvolvimento no GREAT - Grupo de Engenharia de Tecidos - situado na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Lisboa.

Com base nesse projecto, este trabalho teve como prelúdio o acompanhamento de parte dos ensaios *in vivo* de uma estudante de doutoramento do GREAT, a Mestre Susana Raquel Rodrigues Gomes. Nestes ensaios foram implantadas matrizes electrofiadas de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis - a policaprolactona, a gelatina de peixe de água fria e o quitosano - em ratos Wistar, de modo a avaliar o potencial das mesmas na regeneração da pele. Nas fases de implante, observou-se que as matrizes de gelatina mostravam uma capacidade de adesão à ferida superior às matrizes dos outros dois polímeros, não existindo necessidade de recorrer a suturas para as fixar na zona pretendida. Por outro lado, as matrizes de policaprolactona não aderiam por si só, sendo necessário suturá-las à pele. Contudo, ambas as matrizes aparentam ter sido degradadas pelo organismo dos roedores, uma vez que nas fases de colheita não se observaram vestígios de nenhuma das matrizes. Os resultados histológicos, derivados das biópsias efectuadas nas zonas de implante, ainda não estão disponíveis. Porém, face aos resultados intermédios promissores destes dois materiais, definiu-se como objectivo deste trabalho recorrer à técnica de electrofiação e a esses materiais (a policaprolactona e a gelatina) para produzir novas matrizes e avaliar o seu potencial na promoção da regeneração da derme.

Esta dissertação encontra-se dividida em quatro capítulos.

Este primeiro capítulo introdutório começa por uma contextualização do trabalho desenvolvido, seguindo-se uma breve descrição da estrutura anatómica da pele e do papel da engenharia de tecidos na resolução dos problemas acima descritos, através da criação de

¹um aloenxerto é um enxerto proveniente de um doador geneticamente diferente mas da mesma espécie, enquanto que um xenoenxerto é proveniente de um dador de espécie diferente

²A contracção é uma das fases pela qual a pele passa durante a sua regeneração, contudo quando esta ocorre durante demasiado tempo dá origem à perda de funções e desfiguramento na zona da lesão.

substitutos dérmicos. São apresentados ainda alguns dos substitutos mais utilizados hoje em dia e finaliza-se com a apresentação da técnica e dos polímeros utilizados na produção das matrizes.

No capítulo dois são descritos os materiais usados e todo o procedimento experimental, desde os parâmetros usados na técnica de electrofiação para o fabrico das matrizes, até à obtenção do produto final, sendo ainda exposto o processo de reticulação a que as matrizes foram submetidas.

No terceiro capítulo começa-se por expor o estudo de electrofiação prévio à produção das matrizes e os resultados dos testes efectuados às propriedades das soluções usadas. É apresentada também a análise morfológica das matrizes, os seus ângulos de contacto, a sua caracterização química e os ensaios de tracção realizados.

O capítulo quatro encerra esta dissertação e nele são apresentadas as conclusões retiradas do trabalho realizado e perspectivas futuras relativamente ao mesmo.

Em apêndice a esta dissertação, encontra-se ainda uma descrição mais aprofundada dos ensaios in vivo acompanhados na fase inicial deste trabalho.

1.2 A pele

Este órgão é constituído por três camadas: epiderme, derme e hipoderme [5].

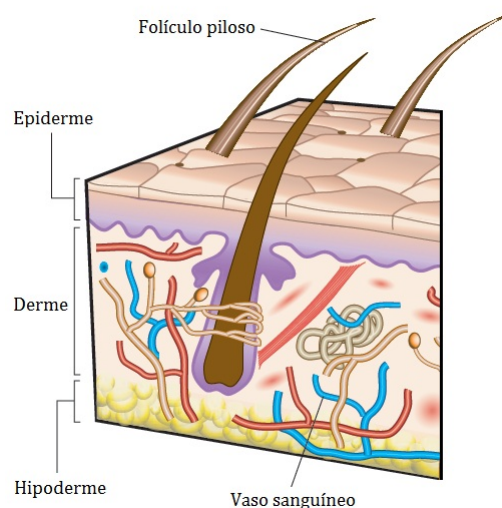


Figura 1.1: Esquema das três camadas da pele (adaptado de [6])

É com estas camadas que o corpo humano conta para desempenhar funções básicas como a regulação da temperatura e hidratação corporal, protecção contra bactérias e outros microorganismos e reparação de traumas a nível cutâneo [7].

O primeiro contacto do nosso organismo com o meio ambiente que nos rodeia é feito através da epiderme, uma estrutura constituída por uma fina camada de células, maioritari-

amente queratinócitos³ [7]. Esta camada possui apenas cerca de 0,1 a 0,2mm de espessura e é através de outra estrutura, a membrana basal, que está ligada à camada seguinte, a derme [6].

A membrana basal, com cerca de 20nm de espessura [8], além de contribuir para as propriedades estruturais da pele, controla ainda a passagem de células e moléculas bioativas entre as duas camadas vizinhas, sendo ainda capaz de se ligar a citocinas [9] (proteínas de baixo peso molecular que participam no processo inflamatório de resposta do sistema imunitário [10] e que estão envolvidas no processo de remodelação e reparação da pele). A epiderme está ligada a esta membrana através de pontos de adesão específicos, as hemidesmossomas, enquanto que a ligação à derme é feita através de fibrilhas circulares de colagénio tipo VII entrelaçadas com fibrilhas de colagénio tipo I e III [9].

A camada seguinte da pele, com uma espessura variável consoante a zona, de aproximadamente 2 a 5 mm [8], é a derme. É ela a responsável pelas propriedades mecânicas da pele. Apesar de altamente vascularizada, esta camada é relativamente acelular, sendo maioritariamente composta por uma estrutura de fibras de colagénio entrelaçadas com fibras de elastina, fibronectina, glucosaminoglicanos, entre outros. Esta estrutura tem o nome de matriz extracelular (ECM, do inglês *Extra celular matrix*) e é produzida e mantida por fibroblastos, o tipo de célula maioritariamente presente na derme [5]. A ECM fornece suporte estrutural e um ambiente propício para a adesão, migração e proliferação das células presentes nos tecidos, contribuindo ainda para a regulação da actividade celular, uma vez que actua também como reservatório de factores de crescimento⁴, potenciando a sua bioactividade [11].

A camada mais profunda da pele, a hipoderme, separa a derme do tecido muscular e é composta essencialmente por tecido adiposo bem vascularizado, contribuindo assim para a regulação da temperatura corporal e também para as propriedades mecânicas deste órgão [5].

1.3 Engenharia de tecidos e o fabrico de matrizes

A engenharia de tecidos teve a sua génese como uma sub-área dos biomateriais, mas veio a ganhar importância ao longo do tempo, sendo agora considerada uma área no seu todo. Ela combina, na mesma abordagem, células, materiais biocompatíveis e factores bioquímicos e físico-químicos. Estas componentes são trabalhadas em laboratório, recorrendo a conhecimentos das áreas da ciência, engenharia e medicina, com o intuito de fabricar matrizes que permitam reparar ou substituir tecidos ou órgãos. Uma matriz que tenha a função de estimular a regeneração de um tecido ou órgão, deve possuir a capacidade de suportar a adesão, diferenciação e proliferação celular *in vitro*, capacidade essa que deve poder ser posteriormente replicada *in vivo* [12].

A nível da sua arquitectura, uma matriz deve ser fabricada de modo a possuir uma

³células responsáveis pela coesão da estrutura em causa e pela função de barreira que a pele providencia contra agressões ambientais externas [5]

⁴substâncias essenciais para a comunicação intercelular e estimulação da proliferação celular

porosidade que permita a vascularização e transporte de nutrientes através desta, assim como permitir a proliferação celular de modo a facilitar a integração com o tecido hospedeiro após a sua implantação. Contudo, esta porosidade deve ser criada de modo a não comprometer significativamente a estabilidade mecânica da matriz, uma vez que as propriedades mecânicas desta devem idealmente aproximar-se das do tecido hospedeiro [11].

No fabrico de uma matriz é essencial a escolha de materiais adequados. Entre as características desejadas nesses materiais, encontram-se:

- a biocompatibilidade - não provocar qualquer tipo de resposta negativa, por parte do tecido hospedeiro, relativamente aos materiais ;
- a bioactividade - possuir uma composição química adequada de modo a promover o bom funcionamento e adesão das células;
- a biodegradabilidade - deve existir sincronização entre a velocidade de degradação dos materiais e a velocidade de substituição dos mesmos por tecido natural, produzido pelas células do nosso corpo, sendo o suporte físico da matriz mantido apenas até que o tecido regenerado tenha integridade suficiente para se suportar a si próprio [12];
- a não citotoxicidade - os produtos resultantes da degradação do material, além de não poderem obviamente ser tóxicos para o ser humano, devem ser excretados de forma natural pelo organismo [13].

Os polímeros, como material usado para fabrico de matrizes, têm sido alvo de atenção por parte da engenharia de tecidos, devido à sua facilidade de processamento, controlo da taxa de degradação e biocompatibilidade [14]. Existem dois tipos de polímeros, sintéticos e naturais. A maioria dos polímeros sintéticos, como o PGA, PLA, PLGA, PVP e PCL, além de possuírem boas propriedades mecânicas, são degradados por hidrólise e pouco sensíveis aos processos enzimáticos, assegurando que a degradação não varie de um paciente para outro [13]. Os polímeros de origem natural incluem proteínas de matrizes extra celulares naturais, como colagénio, glicosaminoglicanos e quitosano. Apesar de simularem o ambiente celular nativo dos tecidos, os polímeros de origem natural possuem a desvantagem de terem pobres propriedades mecânicas [14].

1.4 Substitutos dérmicos

Partindo dos princípios acima descritos, a engenharia de tecidos já deu origem ao lançamento no mercado de alguns substitutos dérmicos. De seguida é apresentada uma breve descrição de alguns dos mais utilizados.

1.4.1 Alloderm[®]

O Alloderm[®] (figura 1.2 a) e b)) é uma matriz dérmica acelular de origem humana. Assemelha-se a um aloenxerto de cadáver, mas processado de modo a remover a compo-

nente celular, inclusive a epiderme, evitando assim as complicações imunológicas associadas a enxertos dérmicos que contêm células do dador [15]. A membrana basal, assim como a ECM, são preservadas de modo a suportar a infiltração de fibroblastos na matriz e permitir a neovascularização e epitelização da mesma [16].

Contudo, apesar de no seu processamento a matriz Alloderm[®] se tornar acelular, esta não deixa de ter origem humana, sendo que tal facto tem um risco associado de transmissão de doenças infecciosas. Além disso, na aplicação desta matriz, que é por si só considerada um procedimento cirúrgico, é vulgarmente necessário um segundo procedimento, que implica a remoção e aplicação de um enxerto de pele de espessura fina do próprio paciente⁵ [18] de modo a permitir a cicatrização total da ferida.

1.4.2 Integra Dermal Regeneration Template[®]

O Integra Dermal Regeneration Template[®] (figura 1.2 c) e d)) é um substituto dérmico bi-camada com uma matriz feita de colagénio tipo I de origem bovina e um glucosaminoglicano (sulfato de condroitina) derivado de cartilagem de tubarão [19]. Esta matriz está acoplada a uma camada fina de silicone, que tem como objectivo proteger a lesão contra bactérias e a perda de humidade durante a fase inicial de regeneração da pele. Assim que a matriz esteja vascularizada e a derme em processo de regeneração, esta camada é removida, normalmente ao fim de duas a três semanas [15].

Contudo, após a remoção da camada de silicone, este substituto necessita, como o Alloderm[®], de um segundo procedimento para a aplicação de um enxerto de pele de espessura fina de modo a cobrir a derme recém-formada [19]. Uma vez que não inclui componentes de origem humana, o Integra Dermal Regeneration Template[®], ao contrário do Alloderm[®], não apresenta risco de transmissão de doenças contagiosas entre humanos, como a Hepatite B e o HIV. Contudo, as componentes de origem bovina introduzem o risco, apesar de mínimo, de transmissão de doenças priónicas, como a BSE (encefalopatia espongiforme bovina).

Apesar das desvantagens referidas, este substituto é dos mais utilizados pelos cirurgiões uma vez que a pele regenerada apresenta bons resultados a nível estético e funcional [15].

⁵uma camada fina de pele, colhida de modo a conter apenas a epiderme e parte da derme. Após a colheita, essa camada é normalmente expandida, recorrendo a um instrumento que efectua pequenos orifícios ao longo do enxerto. Esta expansão permite que um enxerto de pequena dimensão, consiga um aumento de superfície em média de 50% relativamente à recolhida [17].

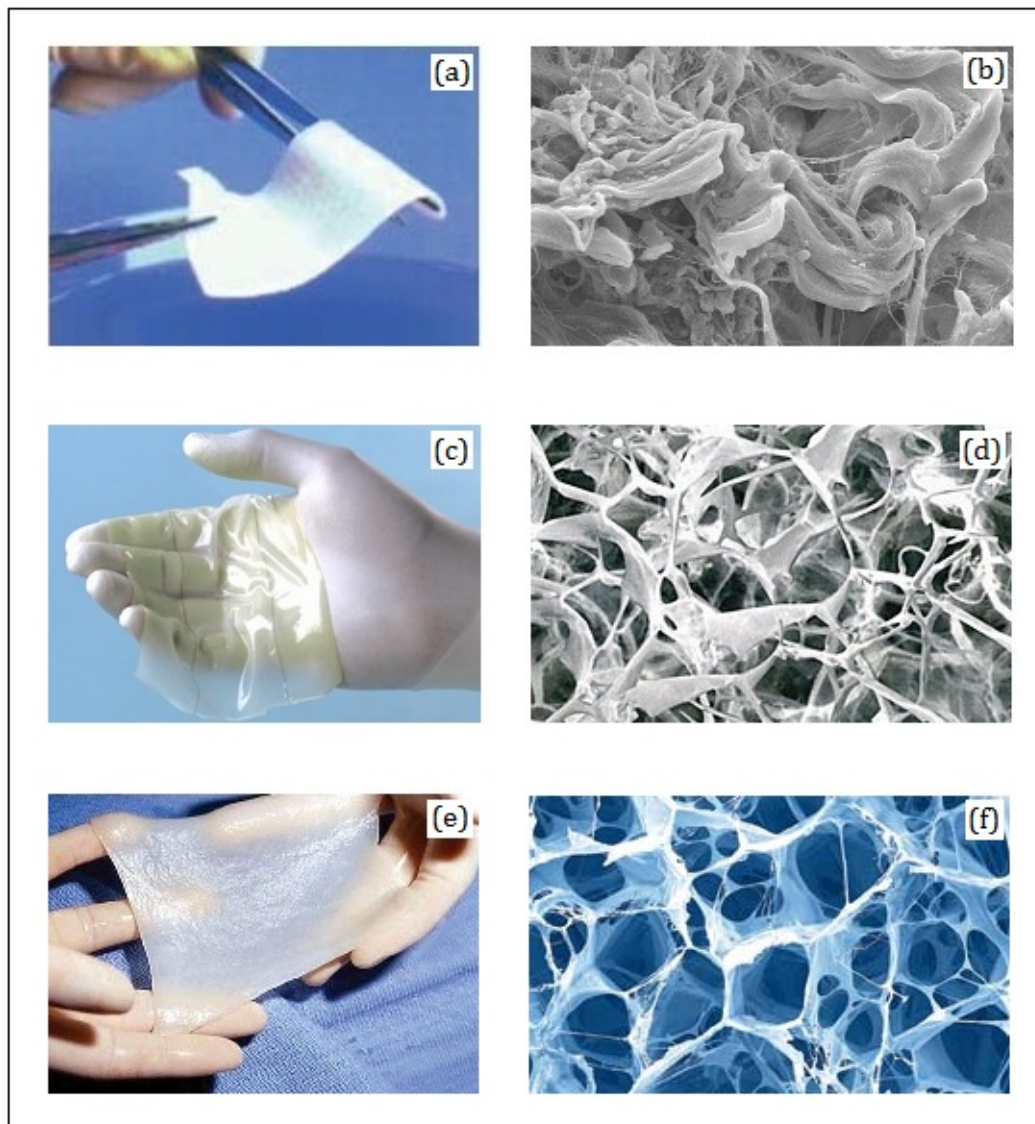


Figura 1.2: Substitutos dérmicos - Aspecto dos substitutos: a)Alloderm® c)Integra® e)Matriderm® - Imagens de SEM: b)Alloderm® d)Integra® f)Matriderm®

1.4.3 Matriderm®

O Matriderm® (figura 1.2 e) e f))é também uma matriz acelular, composta por fibras de colagénio tipo I, III e V , cobertas com elastina. Ambas as componentes são de origem bovina.

A natureza porosa deste substituto é condição essencial para estrutura de suporte à proliferação de fibroblastos e penetração de capilares sanguíneos[20].

Ao contrário do Integra Dermal Regeneration Template®, o Matriderm® evita o tempo de espera entre a colocação do substituto e a remoção da camada de silicone, permitindo, como o Alloderm®, a colocação na hora do enxerto de pele de espessura parcial necessário para a correcta e total cicatrização da ferida [21]. Contudo, uma vez que os seus

componentes também são de origem bovina, o Matriderm apresenta o mesmo risco de transmissão de doenças que os restantes substitutos compostos por materiais com a mesma origem [15].

1.5 Produção de uma matriz dérmica

Vários estudos revelam que a partir dos 65/70 anos, a eficácia inata do ser humano no processo de reparação de feridas crónicas sofre um declínio, demorando mais tempo até atingir a regeneração total e aumentando a frequência de infecções resultantes da ferida [22, 23]. Considerando o envelhecimento mundial da população, aliado ao número de vítimas que diariamente sofre queimaduras profundas e traumatismos na pele, gera-se uma necessidade contínua para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a criação de novos e melhorados substitutos para a regeneração da pele. Na criação destes substitutos, deve ser dada preferência aos que se obtêm de processos simples mas eficazes, de modo a que o seu custo permita a sua disponibilidade ao maior número possível de pessoas [24].

Hoje em dia existem já várias técnicas de criação de matrizes, sendo que cada uma delas é escolhida tendo em conta as funções que a matriz virá a desempenhar depois de implantada e a composição do polímero escolhido [12]. Uma dessas técnicas, e a escolhida para a realização deste trabalho, é a electrofiação. Para a implementação desta técnica são precisos os materiais que serão parte constituinte da matriz. Tendo em conta as propriedades de ambos, escolheu-se uma combinação de um polímero sintético, a policaprolactona, com um polímero natural, a gelatina de peixe de água fria.

1.6 Electrofiação

A electrofiação é uma técnica de simples utilização e eficaz para a produção de matrizes que não requer equipamento sofisticado e permite o controlo do diâmetro das fibras produzidas (da ordem dos nanómetros até alguns micrómetros), uma vez que o alongamento das mesmas é conseguido pela aplicação de um campo eléctrico externo [25].

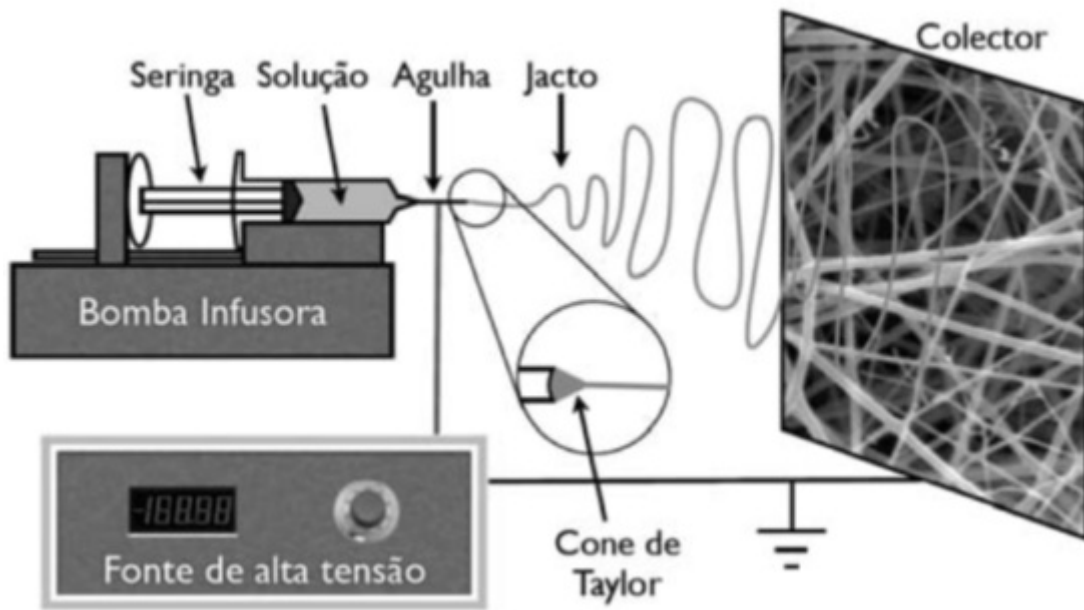


Figura 1.3: Montagem experimental da técnica de electrospinning [26]

Para a execução desta técnica coloca-se, em primeiro lugar, uma solução polimérica numa seringa contendo na sua extremidade uma agulha. A bomba infusora permite controlar o fluxo contínuo de solução à saída da agulha; empurrando o êmbolo da seringa força-se a saída da solução da seringa e forma-se uma gota na ponta da agulha. Ao aplicar uma tensão na agulha, eleva-se o potencial electrostático da gota e as cargas induzidas distribuem-se uniformemente à superfície. A gota sofre então o efeito: das forças electrostáticas de repulsão entre as cargas superficiais e da força de Coulomb do campo eléctrico externo (gerado entre a ponta da agulha e o colector de potencial zero que se encontra a uma dada distância da mesma), formando-se e alongando-se o cone de Taylor (a gota na ponta da agulha adquire uma forma cónica). A partir de um determinado valor de campo eléctrico, as forças electrostáticas repulsivas induzidas na gota superam a tensão superficial da solução polimérica e um jacto é então projectado da ponta do cone de Taylor em direcção ao colector. O jacto é continuamente alongado devido à repulsão entre as cargas eléctricas transportadas. À medida que o solvente se evapora, a solução vai solidificando. Finalmente, dá-se a sua deposição no colector obtendo-se uma matriz de nanofibras dispostas aleatoriamente [25].

O recurso à electrospinning para fabricar matrizes para engenharia de tecidos oferece várias vantagens, entre elas:

- a facilidade de alteração de parâmetros como o campo eléctrico, distância ao colector e fluxo de saída da solução, permite produzir fibras extremamente finas e gerar matrizes com propriedades geométricas e estruturais que oferecem o potencial para replicar a dimensão estrutural da ECM nativa de uma grande variedade de tecidos e órgãos.
- as matrizes produzidas providenciam microestruturas altamente porosas com poros in-

terconectados e um rácio área de superfície/volume extremamente grande, o que é favorável para o crescimento de tecido [24].

1.7 Materiais

1.7.1 Policaprolactona

A poly(ϵ -caprolactona), ou simplesmente policaprolactona, cuja fórmula molecular é $(C_6H_{10}O_2)_n$, é um poliéster obtido através da polimerização do monómero ϵ -caprolactona por abertura do seu anel cíclico [12].

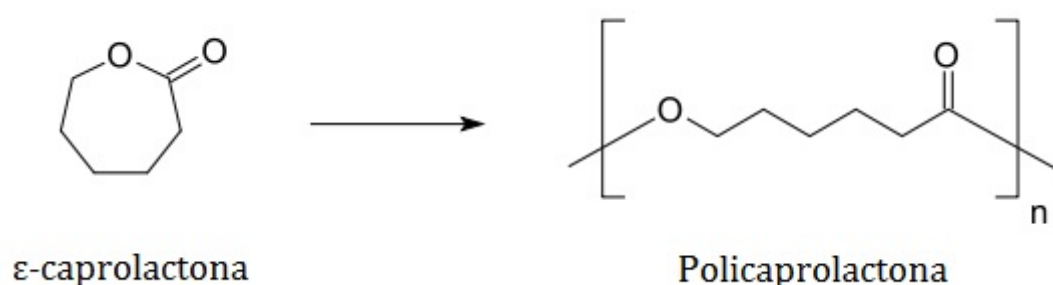


Figura 1.4: Polimerização da policaprolactona a partir da ϵ -caprolactona [27]

É um polímero sintético de custo reduzido, biocompatível e bioassimilável, cuja aplicação na engenharia de tecidos já tem vindo a ser estudada desde os anos 70 [24] visto apresentar vantagens em relação a outros bio polímeros utilizados na época, tal como a facilidade de fabrico e de moldagem consoante a necessidade. O ponto de fusão deste polímero situa-se entre os 55 e os 60°C [28] e, sendo um polímero sintético, a sua natureza semi-cristalina e hidrofóbica atribui-lhe uma taxa de degradação mais lenta do que os polímeros naturais [29]. Este tempo de degradação é de cerca de dois anos [30], facto pelo qual foi originalmente utilizado em dispositivos de libertação controlada de fármacos que permanecessem activos no organismo por um tempo superior a um ano, e em materiais de sutura de degradação lenta. O PCL apresenta ainda propriedades reológicas e viscoelásticas que permitem a sua utilização em várias técnicas de fabrico de matrizes, incluindo a electrofiação [28].

Desde a década passada, a investigação baseada neste polímero tem vindo a aumentar devido à sua versatilidade, revelando-se promissor para aplicações médicas futuras, como suturas, vasos sanguíneos artificiais, dispositivos de libertação controlada de fármacos, substitutos ósseos e revestimento de feridas [12].

1.7.2 Gelatina

Sendo um material de origem natural e como tal biocompatível e bioassimilável, a gelatina tem sido bastante utilizada na engenharia de tecidos uma vez que tem um custo

relativamente baixo [31].

O colagénio, a principal proteína estrutural encontrada na ECM, é rico em sequências arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) [32]. As sequências RGD são pontos de adesão específicos das integrinas (moléculas de adesão celular que auxiliam na ligação entre células e também na ligação destas à ECM) presentes na membrana celular. Se esta sequência estiver acoplada a uma superfície sólida, faz com que as células adiram à mesma [33]. Na sua constituição, a gelatina possui as sequências RGD do colagénio, fazendo-a altamente eficaz na adesão celular [34].

Sabe-se ainda que uma estrutura de nanofibras de gelatina, fabricada pela técnica de electrofiação, pode aumentar a proliferação e adesão celular [35].

Ultimamente tem sido dada especial atenção à utilização de gelatina proveniente de peixe, em vez da habitualmente gelatina de origem mamífera. A principal diferença entre estas duas é a temperatura de gelificação. Na gelatina de peixe, esta temperatura é muito mais baixa, permitindo assim o processamento do material à temperatura ambiente [36].

1.7.3 Combinação PCL/gelatina

Como já referido, a maioria dos polímeros sintéticos oferece boas propriedades mecânicas e uma taxa de degradação lenta. Contudo, faltam-lhes locais de reconhecimento celular, como é o caso do complexo RGD. As matrizes preparadas exclusivamente com polímeros sintéticos revelam frequentemente pobre adesão e proliferação a nível celular. Já a maioria dos polímeros naturais mostram excelente afinidade celular devido à presença de componentes da ECM, mas têm más propriedades mecânicas [37].

O conceito de misturar gelatina com outros polímeros sintéticos, como é o caso do PCL, é uma aproximação que pode não só reduzir o potencial problema de citotoxinas, como resultado de usar um reagente químico de reticulação (para uma aplicação biomédica de longo prazo, uma estrutura deste género tem de ser reticulada uma vez que este tratamento permite melhorar tanto a resistência à água como a performance termomecânica da gelatina [38]), mas também oferecer uma solução para ultrapassar ambas as desvantagens de polímeros sintéticos e naturais, produzindo um novo material com boa biocompatibilidade e propriedades mecânicas e físico-químicas melhoradas [31].

Zhang et al. [31], testaram uma matriz compósita de PCL/gelatina (com concentrações iguais de ambos os polímeros) produzida por electrofiação, com o objectivo de potenciar e expandir o potencial de aplicações da gelatina em matrizes para engenharia de tecidos. Verificaram, através de estudos de bioactividade e biocompatibilidade, que a matriz compósita exhibe não só uma óptima capacidade como matriz para migração celular como também permite a penetração ou infiltração celular dentro da estrutura fibrosa de gelatina/PCL. Os investigadores referem que esse facto é devido essencialmente a dois factores:

- a dissolução da componente gelatina da matriz durante a cultura celular, criando assim mais espaço para a migração celular em vez de as células aderirem somente à superfície

da matriz de PCL.

- o facto de matriz estudada revelar boas propriedades de alongação e deformação, sendo que estas propriedades mecânicas favoráveis providenciam a facilidade de abertura de espaços para penetração celular a níveis mais profundos da matriz.

As vantagens de uma matriz deste género, destacadas por estes investigadores, passam ainda pelo facto de que a introdução do polímero natural no PCL providenciar uma melhoria na hidrofilicidade e afinidade celular devido à constante libertação de moléculas de gelatina da matriz, criando assim um ambiente favorável à adesão celular e proliferação.

Outros estudos [39], [37], aproveitaram o potencial desta matriz compósita e decidiram testar as vantagens da combinação destes dois materiais mas em concentrações diferentes. Esses estudos confirmaram que a técnica de produção destas matrizes (electrofiação) se revela eficiente na modificação das matrizes constituídas somente por PCL. As propriedades mecânicas e a hidrofilicidade do PCL, (factores cruciais no uso destas matrizes como substrato para cultura *in vitro*) foram afectadas positivamente pela introdução da gelatina nas matrizes. Ghasemi-Mobarakeh et al [39], analisaram estas matrizes do ponto de vista químico, por FTIR, sendo revelada a presença de grupos amida e grupos carbonilo, indicadores que permitem concluir que ambos os polímeros estão presentes. Este grupo de investigação concluiu ainda que a introdução da gelatina potencia a interacção das células com a matriz através da agregação de moléculas que favorecem a adesão celular, permitindo que as células consigam exercer forças de interacção maiores com a matriz, factor obrigatório na mobilidade celular.

Um grupo de investigadores turcos [40], estudou o comportamento celular numa matriz compósita de nanofibras de PCL/gelatina (em proporções iguais) e verificaram que esta matriz, além de revelar uma porosidade adequada para aplicações em engenharia de tecidos, provou ser um suporte eficiente à proliferação de fibroblastos de rato durante o período de cultura celular.

Chong et al [24] realizaram também um estudo partindo de um dos requisitos da engenharia de tecidos, em que a criação de substitutos de pele deve assentar numa matriz biocompatível e bioassimilável através da qual os fibroblastos possam migrar e consequentemente povoar. Nesse estudo, associou-se a um dispositivo médico presente no mercado para revestimento e protecção de feridas feito de poliuretano, o Tegaderm®, uma matriz compósita de PCL/gelatina, em proporções iguais, fiando a matriz directamente em cima do dispositivo através da técnica de eletrofiação. Esta associação foi feita com vista a melhorar o potencial deste dispositivo, tornando-o num auxiliar à regeneração dérmica que ao mesmo tempo protege a lesão durante a sua regeneração. Este estudo refere ainda a vantagem de que a técnica de produção utilizada permite obter matrizes que se assemelham à ECM natural da pele, sendo que a análise morfológica da matriz revelou porosidade adequada para um substituto dérmico e, tal como o estudo de Zhang et al. [31], Chong et al [24] conclui que esta matriz se revela um bom suporte para a proliferação celular, neste caso, de fibroblastos humanos de origem dérmica.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

Estas propriedades únicas das matrizes obtidas a partir da combinação de nanofibras de PCL e de gelatina requerem então especial atenção devido ao seu potencial para a criação de análogos dérmicos na assistência à regeneração da pele.

2

Materiais e métodos

2.1 Soluções

A produção das matrizes iniciou-se com a preparação das soluções poliméricas. Ambos os polímeros, o PCL (massa molecular $M_n = 70\text{-}90\text{kg/mol}$) e a gelatina de peixe de água fria (massa molecular $M_n = 60\text{kg/mol}$), foram adquiridos à Sigma-Aldrich. O solvente usado foi o ácido acético glacial (grau de pureza $\geq 99.7\%$), adquirido à Panreac. Todos os materiais foram usados como recebidos do fabricante, sem nenhum tipo de processamento prévio.

2.1.1 Preparação das soluções

Neste trabalho foram produzidas sete soluções diferentes:

- Cinco destas soluções (cuja composição detalhada se encontra na tabela 2.1) são usadas individualmente, cada uma delas para obter uma matriz de composição diferente. Elas foram obtidas dissolvendo quantidades variáveis de PCL e de gelatina num solvente contendo 95% de ácido acético glacial e 5% de água destilada.
- As outras duas soluções são usadas em conjunto, de modo a obter uma matriz híbrida constituída por dois tipos de nanofibras de polímeros diferentes. Uma das soluções é composta por 21% de gelatina dissolvida em ácido acético a 95% (designada por **S21Gel**) e a outra por 18% de PCL dissolvido em ácido acético a 96% (designada por **S18PCL**).

Tabela 2.1: Composição das soluções

Designação	Solutos (20%)		Solvente (80%)	
	<i>PCL</i> (% soluto)	<i>Gelatina</i> (% soluto)	<i>Ácido Acético</i> (% solvente)	<i>Água destilada</i> (% solvente)
S90:10	90	10		
S70:30	70	30		
S50:50	50	50	95	5
S30:70	30	70		
S10:90	10	90		

Todas as percentagens referentes às soluções são percentagens mássicas (w/w).

Em todas as soluções, o processo de preparação foi idêntico. Sabendo de antemão as quantidades, a adição dos constituintes de cada solução seguiu sempre a mesma ordem: primeiro a água, seguido do ácido acético, e por fim o(s) polímero(s).

As soluções preparadas eram posteriormente dispostas num agitador magnético de um dia para o outro, de modo a garantir a dissolução total do(s) polímeros.

Todas as soluções foram utilizadas num período de 24h após a sua produção, de modo a evitar a degradação do(s) polímero(s).

Inicialmente, durante o processo de fiação das soluções que continham os dois polímeros, verificou-se que, juntamente com as nanofibras, eram também depositados pequenos aglomerados de polímero que não eram visíveis na solução. De modo a resolver este problema, adicionou-se um procedimento prévio à fiação: submeter as soluções a um banho de ultrasons. Analisando ao microscópio óptico a morfologia das fibras obtidas após este procedimento, foi detectado que as fibras com maior proporção de PCL sofriam uma redução de diâmetro superior ao sofrido pelas fibras com maior proporção de gelatina. Assim, após alguns testes e de modo a uniformizar os diâmetros obtidos para as fibras das cinco matrizes, a duração desse banho foi definida consoante a concentração dos polímeros. Portanto, para as soluções S90:10, S70:30, S50:50, S30:70, S10:90, definiu-se um banho de ultrasons de 2h, 2h30, 3h, 3h30 e 4h, respectivamente.

2.1.2 Caracterização das soluções

De modo a avaliar a forma como as propriedades das soluções afectam a qualidade das matrizes obtidas, foram efectuados testes à condutividade, viscosidade e tensão superficial de todas as soluções.

2.1.2.1 Condutividade

A condutividade é um dos parâmetros que regula a estabilidade do jacto no processo de electrofiação e consequentemente a morfologia e diâmetro das fibras obtidas neste processo.



Figura 2.1: Aspecto final das soluções PCL:Gelatina

A condutividade de uma solução representa a facilidade com que esta é capaz de conduzir corrente eléctrica e é função da quantidade de iões presentes na solução. Quando uma diferença de potencial é aplicada a uma determinada quantidade de solução, a intensidade de corrente que flui por essa solução será proporcional à condutividade. Deste modo, soluções com elevada condutividade serão submetidas a uma força electrostática repulsiva maior do que soluções de baixa condutividade, provocando um maior estiramento ¹ do jacto durante a formação das fibras, obtendo-se assim fibras mais finas [41].



Figura 2.2: Aparelho de medição da condutividade utilizado (retirado do manual do fabricante, disponível em: <http://www.hannacom.pt>. Consultado a: 20/09/2012)

A condutividade das soluções foi medida com um medidor de condutividade (modelo HI 4521 - HANNA instruments).

Foram efectuadas três medições a cada solução. Previamente a cada medição, a sonda foi mergulhada em água ultra pura de modo a eliminar eventuais impurezas presentes no seu

¹O estiramento é o processo de alongamento que o jacto sofre desde a ponta da agulha até ao colector

sensor. Todas as medições foram feitas com as soluções a uma temperatura de 24°C.

2.1.2.2 Tensão superficial

A tensão superficial é uma propriedade dos fluidos e tal como o nome indica, refere-se à tensão na camada superficial de um fluido.

Entre duas moléculas vizinhas, existem sempre forças de atracção. No interior de um fluido, essas forças encontram-se em equilíbrio uma vez que cada molécula é atraída em todas as direcções pelas moléculas vizinhas. Contudo, as moléculas à superfície de um fluido apenas partilham forças de atracção com as moléculas interiores, gerando uma tensão que faz com que a superfície do fluido adquira uma forma curva [41]. Durante o processo de electrofiação, quando uma gota de solução é sujeita a um campo eléctrico, a sua tensão superficial actua em oposição às forças electrostáticas repulsivas induzidas na gota, formando-se o já referido cone de Taylor. Esta tensão revela-se um parâmetro de interesse, uma vez que durante o processo de electrofiação pode influenciar o diâmetro das fibras e o aparecimento de contas ao longo das mesmas.

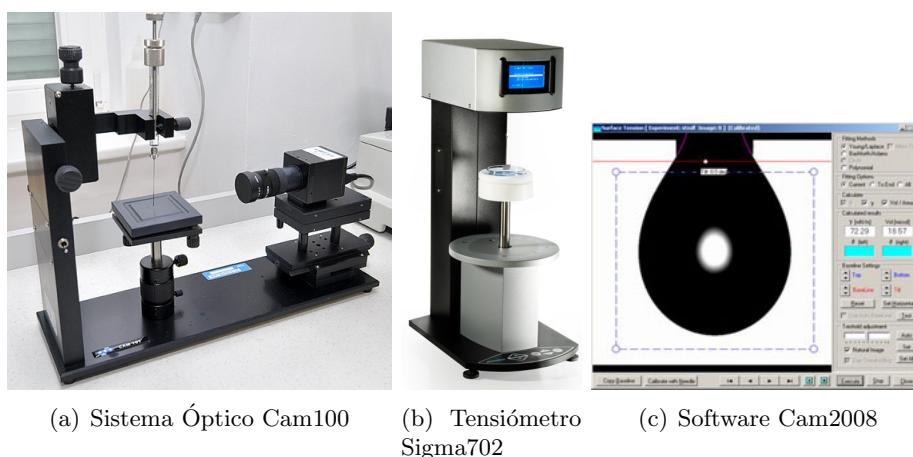


Figura 2.3: Sistema de medição da tensão superficial (figura 2.3(b) retirada do manual do fabricante, disponível em: <http://www.attension.com/>. Consultado a: 20/09/2012

A medição da tensão superficial foi efectuada no Departamento de Química, num goniómetro constituído por um sistema óptico (modelo Cam100) e um software de captura de imagem (Cam2008), ambos do fabricante KSV instruments.

Foram efectuadas cinco medições de tensão superficial a cada solução, usando uma seringa de 1ml (B|Braun) com uma agulha de calibre 23 acoplada. O método de medição consistiu na colocação da seringa com solução polimérica no sistema óptico e provocar a formação de uma gota na ponta da agulha. Através do software, essa gota é então analisada e calculada a tensão superficial. Para proceder a esse cálculo, é preciso introduzir no software a densidade da solução a analisar. De modo a obter esse valor, utilizou-se um tensiómetro

(modelo sigma702 - KSV instruments), no qual uma pequena esfera de vidro é submersa na solução, sendo automaticamente calculada a densidade da mesma.

2.1.2.3 Viscosidade

A viscosidade está relacionada com o modo como as cadeias moleculares dos polímeros numa solução interagem entre si. É este cruzamento que permite o alongamento do jacto sem interrupções e consequentemente a qualidade das fibras obtidas. Numa solução, o peso molecular e a concentração e natureza dos polímeros incluídos determinam o valor da sua viscosidade. Quanto maiores, maior a viscosidade da solução.

Soluções demasiado viscosas tornam-se difíceis de extrair (pelo campo eléctrico) e de estirar (pelas cargas transportadas) da agulha. Contudo, fibras derivadas de soluções com uma viscosidade demasiado baixa têm tendência a apresentar contas ao longo da sua extensão [41]. Um equilíbrio na viscosidade da solução é então uma condição necessária para o processo de electrofição.



Figura 2.4: Reómetro rotacional Bohlin Gemini HR nano. (Retirado do manual do fabricante, disponível em: <http://www.malvern.com/>. Consultado a: 21/09/2012)

A reologia das soluções foi avaliada nas instalações do CENIMAT/I3N, num reómetro rotacional (modelo Bohlin Gemini HR nano - Malvern instruments), com uma geometria "cone e prato" de diâmetro 40mm e ângulo de 2°. Neste reómetro, a solução é colocada entre um prato fixo e um cone. A rotação desse cone com uma determinada velocidade angular faz com que a solução seja sujeita a um escoamento de Couette ², permitindo que o reómetro calcule a sua viscosidade consoante a tensão de corte a que está sujeita.

Os ensaios foram efectuados a uma temperatura de 25°C.

²Na dinâmica de fluidos, o escoamento de Couette refere-se ao fluxo laminar de um fluido viscoso, no espaço entre dois pratos paralelos, um dos quais se encontra em movimento relativamente ao outro

2.2 Produção das matrizes

2.2.1 Montagem experimental

Consoante o tipo de matriz, foram utilizadas duas configurações de electrofiação diferentes.

Matrizes PCL:Gelatina

Na produção das matrizes simples, a partir de soluções com dois polímeros, utilizou-se a montagem experimental apresentada na figura 2.5.

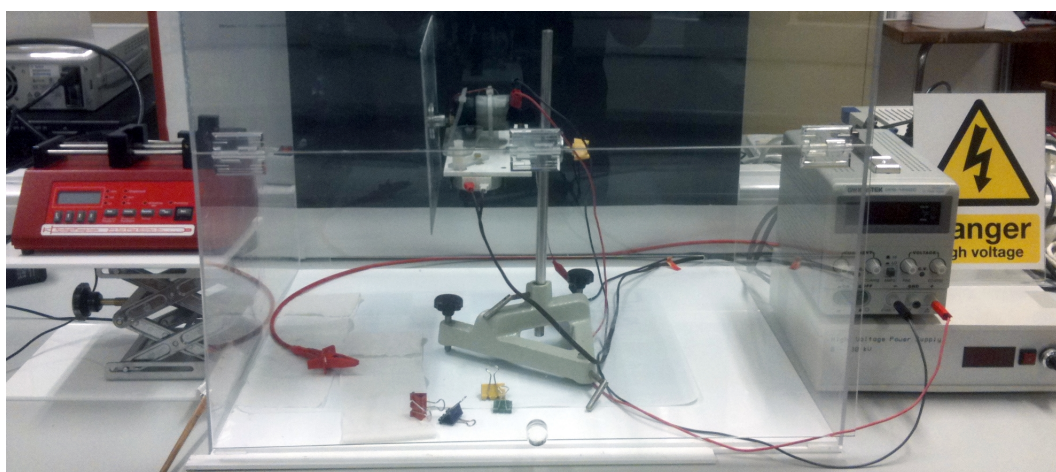


Figura 2.5: Montagem experimental para a produção das matrizes PCL:Gelatina

Nesta montagem, a solução é colocada numa seringa graduada de 5ml e diâmetro interno de 12.74mm, do fabricante B|Braun. A seringa tem acoplada uma agulha de calibre 23. Estes dois componentes são introduzidos numa bomba infusora, modelo Fusion100 do fabricante CHEMYX. Para gerar a tensão necessária, é utilizada uma fonte de alta tensão (construída no laboratório) que é ligada à agulha metálica através de um cabo com crocodilo. Da montagem faz ainda parte um colector plano vertical (também construído no laboratório), colocado perpendicularmente à seringa, que consiste numa placa metálica (ligada à terra), com uma dimensão de 20cm×20cm. Esta placa encontra-se acoplada a dois motores de modo a permitir a rotação no plano vertical e translação horizontal da mesma. Durante a produção, a placa metálica é revestida com papel de alumínio.

Matriz híbrida PCL+Gelatina

Para a produção da matriz híbrida, a montagem usada é a da figura 2.6

Nesta montagem, em vez de um colector plano, é usado um colector rotatório cilíndrico, construído também no laboratório. Este colector consiste num cilindro de acrílico ligado à

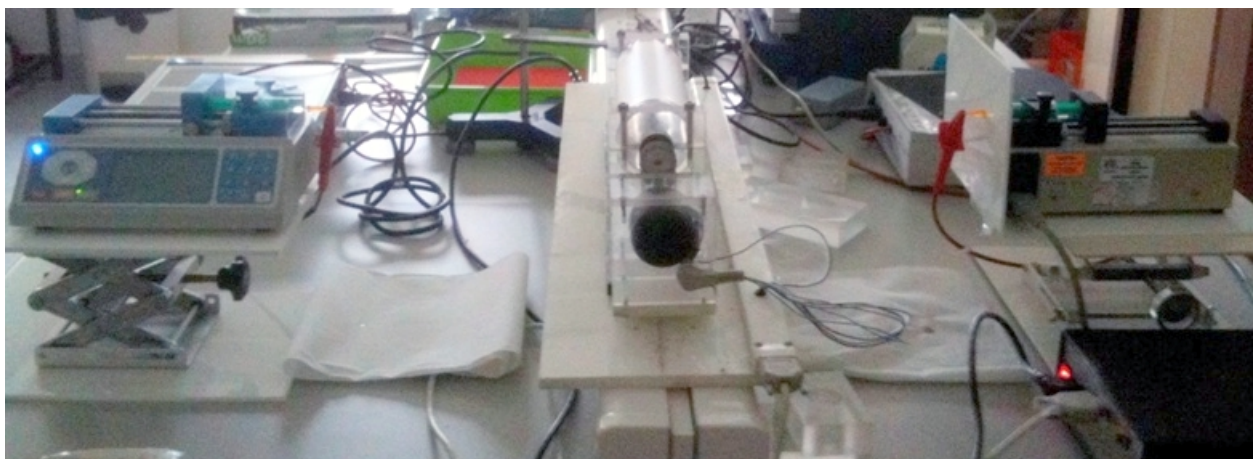


Figura 2.6: Montagem experimental para a produção da matriz híbrida

terra e acoplado a um motor que permite a rotação em torno do seu eixo. O motor tem associado um controlador que possibilita o ajuste da velocidade de rotação. Durante a produção, o cilindro está revestido com papel de alumínio.

As restantes componentes da montagem são análogas à anterior, mas em duplicado. São utilizados dois conjuntos com seringas, agulhas, bombas e fontes de tensão iguais às referidas na montagem anterior. Cada um dos conjuntos é colocado em lados opostos do cilindro (como se pode verificar na figura 2.6), de modo a direccionar para si as agulhas. A estabilidade do processo de fiação é reforçada adicionando um disco metálico comum orifício no centro através do qual passa o capilar da agulha. Deste modo aumenta-se a convergência do campo eléctrico e diminui-se a dispersão das fibras.

2.2.2 Electrofiação

Matrizes PCL:Gelatina

Depois de preparada, a solução polimérica é colocada dentro da seringa. A produção da matriz inicia-se com a inserção dos parâmetros com que a fiação irá decorrer.

Após vários testes de optimização, foram escolhidos os seguintes parâmetros de produção: tensão de 16kV, distância agulha-colector de 20cm e um caudal de 0,3ml/h. O processo de electrofiação de cada matriz decorre durante um período de 6h.

Sabendo que a deposição ocupa a totalidade da folha de alumínio e apenas é necessária uma matriz com cerca de 12cm de diâmetro para o tratamento pós-produção, na folha de alumínio são também colocadas quatro lamelas quadradas de 22×22mm e oito lamelas circulares de 12mm de diâmetro, que são usadas posteriormente na caracterização das matrizes.

Recorrendo a esta montagem, são obtidas então cinco matrizes diferentes, cuja designação tem como base a solução que lhes deu origem. Assim, obtemos as matrizes **M90:10**, **M70:30**, **M50:50**, **M30:70** e **M10:90**.

Matriz híbrida PCL+Gelatina

A produção desta matriz tem como objectivo obter uma proporção igual de ambos os polímeros mas cada um em fibras separadas.

Para a produção desta matriz, o protocolo experimental é semelhante ao das matrizes PCL:Gelatina, mas agora em duplicado.

Após vários testes de optimização, foram escolhidos os seguintes parâmetros de produção:

- Gelatina: tensão de 11kV, distância agulha-colector de 10cm e um caudal de 0,3ml/h;
- PCL: tensão de 8kV, distância agulha-colector de 10cm e um caudal de 0,35ml/h;
- Velocidade de rotação entre as 200 e as 300 rpm.

O processo de electrofiação desta matriz demora 1h30 até estar completo e a deposição obtida ocupa uma largura de 9cm e um comprimento igual ao do perímetro do cilindro. Apenas são necessários 10cm de altura de deposição para o tratamento pós-produção, logo optou-se por colocar também lamelas quadradas de 22×22mm e lamelas circulares de 12mm de diâmetro que são usadas posteriormente na caracterização da matriz.

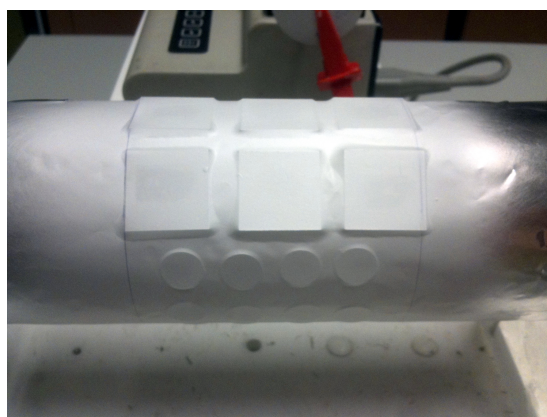


Figura 2.7: Disposição das lamelas na deposição da matriz híbrida

Com recurso a esta montagem, obtém-se a matriz híbrida com fibras de PCL e de gelatina, cuja designação é **M1+1**.

2.2.3 Reticulação

Uma matriz que inclua gelatina no seu conteúdo tem de ser submetida a um tratamento de reticulação com o propósito de diminuir a sua taxa de degradação e melhorar o seu desempenho termomecânico.

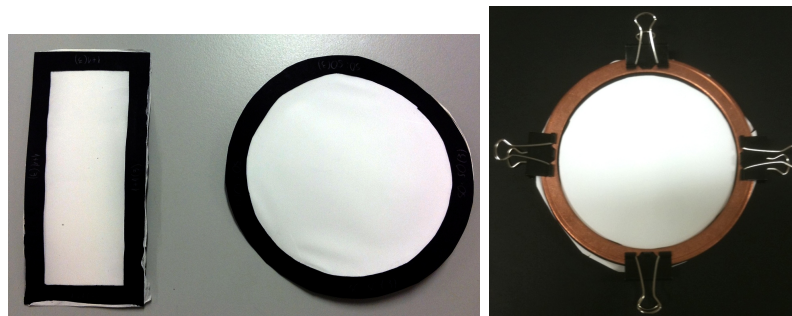
Imediatamente a seguir à sua obtenção, as matrizes foram colocadas durante cerca de 40h num exsiccador antes de se proceder à sua reticulação. Este período de espera tem como

objectivo eliminar vestígios de solvente e evitar assim uma possível influência negativa deste no tratamento.

A reticulação decorre no interior de um recipiente de plástico hermeticamente selado, onde são colocadas as matrizes. Dentro desse recipiente é também colocado um cristalizador com cerca de 25ml de uma solução de glutaraldeído (GTA) a 50% (Sigma-Aldrich). O recipiente selado é depois colocado num forno a 40° durante 4h, de modo a criar uma atmosfera de vapor de GTA que irá reticular a gelatina.

Em testes prévios, verificou-se que este tipo de matrizes tem tendência para contrair durante o processo de reticulação. De modo a evitar essa contracção e previamente à introdução das matrizes dentro do recipiente de plástico, a matriz 1+1 é colocada entre dois aros rectangulares de cartão canelado e presa com molas metálicas, enquanto que as restantes matrizes são colocadas entre dois aros metálicos circulares e também presas com o mesmo tipo de molas.

Uma vez que o GTA é um composto tóxico, após o tratamento de reticulação as matrizes são retiradas do interior do recipiente de plástico e deixadas a repousar numa hotte de um dia para o outro. De modo a reforçar a eliminação de quaisquer resíduos de GTA, as matrizes são de seguida colocadas novamente num exsicador, durante um período mínimo de três dias, antes de proceder a qualquer manuseamento das mesmas. As matrizes sujeitas a cultura celular foram colocadas no exsicador durante duas semanas.



(a) Matrizes M1+1 e M50:50 não reticuladas (b) Matriz M50:50 reticulada

Figura 2.8: Aspecto das matrizes

2.3 Caracterização das matrizes

2.3.1 Ensaio de tracção

Com a finalidade de analisar as propriedades mecânicas das matrizes e verificar de que maneira as diferentes soluções ou métodos de fabrico usados afectam essas propriedades, foram efectuados ensaios de tracção. Estes ensaios decorreram no laboratório de materiais poliméricos do Departamento de Ciência dos Materiais, numa máquina de tracção (Rheome-

tric Scientific), com uma célula de carga com capacidade máxima de 20N e controlada pelo software MINIMAT (P.L. Thermal Sciences, versão 1.60).

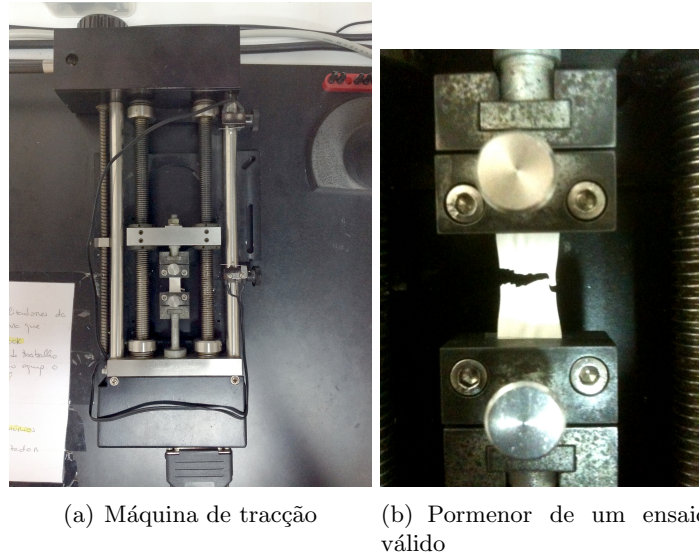


Figura 2.9: Ensaio de tracção

Foram produzidas três réplicas de cada uma das seis matrizes e de cada réplica foram recortadas cinco amostras, com as dimensões de $3\text{cm} \times 1\text{cm}$, sendo a espessura das mesmas medida com um micrómetro (Mitutoyo Corporation - resolução $0,001\text{mm}$). Foram realizados ensaios de tracção a todas essas amostras, num total de 90 ensaios válidos.

Cada tipo de matriz tem uma resposta diferente quando submetida a um ensaio de tracção. Consoante o tipo de matriz e de modo a otimizar a informação obtida, estabeleceu-se a velocidade a que cada ensaio ia decorrer de acordo com a tabela 2.2. Para todos os ensaios, foi definido que a carga máxima aplicada seria a capacidade máxima da célula de carga, 20N.

No decorrer dos ensaios, os valores da combinação força aplicada (F) versus alongamento

Tabela 2.2: Velocidade do ensaio consoante o tipo de matriz

Tipo de matriz	Velocidade (mm/min)
M90:10	2
M70:30	2
M50:50	1
M30:70	0,5
M10:90	0,5
M1+1	1

(Δl) foram sendo adquiridos pelo software de controlo da máquina. Recorrendo ao software Microsoft Excel, esses valores foram convertidos para pares de valores tensão (σ) versus deformação (ϵ). Nessa conversão foram usadas as equações (1) e (2), onde A é referente ao

valor da área da secção recta da amostra traccionada e l_0 o seu comprimento inicial.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (2.1) \quad \varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (2.2)$$

Através dos pares de tensão versus deformação, obteve-se uma curva de tracção. Numa curva de tracção típica, a zona inicial é designada de região elástica uma vez que, por norma, para valores de tensão relativamente baixos, a deformação de um material é linearmente proporcional à tensão aplicada, ou seja, tem um comportamento elástico. Nessa zona, a relação entre a tensão e a deformação do material é dada pela lei de Hooke: $\sigma = E \times \epsilon$, onde E é uma constante designada por Módulo de Young.

O módulo de Young é uma grandeza que indica a rigidez de um material e o seu valor é o declive da curva de tracção na zona elástica. O módulo de Young de cada amostra foi obtido introduzindo os pares tensão versus deformação, contidos na zona elástica, numa "macro" para Excel desenvolvida no GREAT, sendo depois processados estatisticamente.

2.3.2 Análise morfológica

Na fase inicial de testes, os produtos resultantes do electrofição foram sendo observados num microscópio óptico (Nikon Eclipse LV100) de modo a definir os melhores parâmetros de produção consoante a qualidade das fibras obtidas. Os produtos finais foram visualizados por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM - do inglês, *Scanning Electronic Microscopy*) Este método permite visualizar a estrutura das matrizes ao pormenor, com uma resolução que possibilita não só avaliar falhas nas mesmas, mas também a posterior medição de diâmetros das fibras constituintes de cada matriz.

No SEM, as imagens são obtidas fazendo incidir um feixe de electrões que percorre toda a superfície da amostra a analisar. A interacção deste feixe com a superfície provoca a emissão de electrões e de raios-x que ao serem detectados pelo aparelho permitem obter informações relativas à morfologia e composição dessa superfície. Essas informações são apresentadas ao utilizador como uma imagem de alta resolução da amostra analisada.

As imagens de SEM foram adquiridas nas instalações do CENIMAT/I3N no equipamento Auriga Crossbeam (FIB-SEM) do fabricante Carl Zeiss. De modo a melhorar a condutividade das amostras, estas foram fixadas com fita adesiva dupla face de carbono num disco metálico e revestidas por pulverização catódica, com uma liga de ouro-paládio (nas percentagens 20% e 80%, respectivamente) de 8nm de espessura.

A medição dos diâmetros das fibras foi feita recorrendo ao software ImageJ (National Institutes of Health) e a sua análise estatística foi feita com o software OriginPro 8 (Origin Lab) e com o Excel.

2.3.3 Ângulo de contacto

Uma das maneiras de medir a hidroflicidade das matrizes é através da medição do ângulo de contacto.



Figura 2.10: Equipamento SEM Auriga Crossbeam (FIB-SEM)

Tal como a tensão superficial, o ângulo de contacto das matrizes foi medido num goniómetro, constituído pelo mesmo sistema óptico Cam100 (figura 2.3(a)), mas um software de captura de imagem diferente (Cam100), ambos do fabricante KSV instruments. Estas medições foram efectuadas no Departamento de Química.

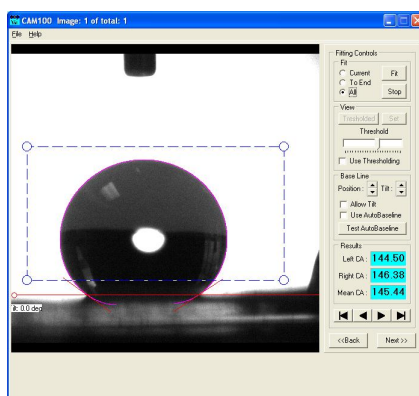


Figura 2.11: Software Cam100 durante uma medição

Para proceder à medição, as matrizes a analisar foram colocadas no sistema óptico e colocou-se uma gota de água na superfície das mesmas. O ângulo de contacto é o ângulo formado pela tangente à gota, na intersecção sólido-líquido-ar formada assim que a gota entra em contacto com uma superfície sólida. Através do software, que recorre a um método de ajuste baseado na equação de Young-Laplace, essa interacção é então analisada e calculado o ângulo de contacto. Para valores acima de 90° , a superfície sólida é considerada hidrofóbica, enquanto que para valores abaixo, a superfície é considerada hidrofílica.

As matrizes utilizadas para este processo foram fiadas sobre lamelas quadradas de $22\text{mm} \times 22\text{mm}$. Para cada matriz, foram efectuadas cinco medições de ângulo de contacto em duas amostras diferentes, usando uma seringa de 1ml (B|Braun) com uma agulha acoplada.

2.3.4 FTIR-ATR

Uma ferramenta útil e conveniente para inferir sobre a natureza química e molecular das matrizes obtidas é a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*).

Numa análise FTIR, faz-se incidir um feixe de luz infravermelha sobre uma amostra. A radiação infravermelha quando absorvida por uma molécula orgânica é convertida em energia de vibração molecular, que é depois transmitida ao aparelho. A frequência dessas vibrações está relacionada com grupos específicos das ligações químicas das moléculas. Logo, a absorção de energia consoante os vários comprimentos de onda da radiação infravermelha, permite conhecer quais os grupos específicos presentes na amostra.

Numa análise FTIR tradicional, o feixe de infravermelho atravessa a amostra perpendicularmente, implicando que as amostras a analisar tenham espessuras muito pequenas. De modo a permitir a análise directa das matrizes, foi acoplado ao aparelho de FTIR um módulo ATR (do inglês, *Attenuated Total Reflection*). Este módulo possui um cristal que faz com que o feixe de infravermelho incida na amostra com um determinado ângulo, sendo depois reflectido internamente dentro do cristal. Quando essa reflexão ocorre, existe uma onda, dita evanescente, que "viaja" pelo exterior do cristal, sondando a amostra numa profundidade entre 0,5 e 2 μm , permitindo assim a análise FTIR apenas da superfície do material.

A análise FTIR-ATR foi realizada nas instalações do CENIMAT/I3N num aparelho Nicolet 6700 FT-IR, com um módulo ATR SMART iTR, ambos do fabricante Thermo Scientific. O intervalo de números de onda analisado situou-se entre os 4500 e os 500 cm^{-1} .



Figura 2.12: Aparelho Nicolet 6700 FT-IR com o módulo SMART iTR acoplado (retirado do manual do fabricante, disponível em: <http://www.thermoscientific.com>. Consultado a: 20/09/2012)

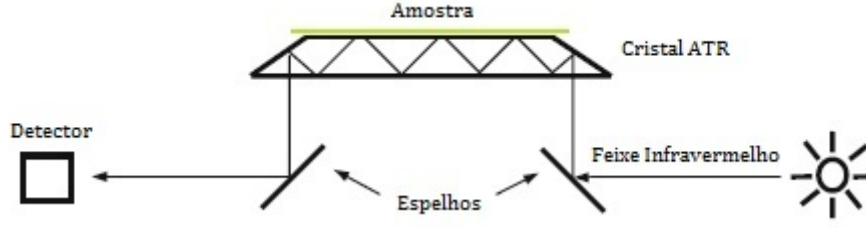


Figura 2.13: Tecnologia ATR (imagem adaptada de [42])

2.3.5 Porosidade

Foi já referido na introdução que a porosidade é uma característica importante na arquitectura de uma matriz. Ela foi calculada recorrendo à equação 2.3:

$$Porosidade = \left(1 - \frac{\rho_m}{\rho_{mat}}\right) \times 100 \quad (2.3)$$

Onde ρ_m é a densidade aparente da matriz e ρ_{mat} a densidade do material usado.

O valor da densidade da matriz é obtido dividindo a sua massa pelo respectivo volume, ou seja, $\rho_{mat} = \frac{massa_{mat}}{volume_{mat}}$.

Uma vez que as nanofibras das matrizes são constituídas por PCL e gelatina, o cálculo da densidade do material usado tem de ter em conta as proporções de cada polímero. Essa proporção é tida em conta na equação 2.4:

$$\rho_{mat} = \frac{\rho_{PCL} \times \rho_{gel}}{\rho_{PCL} \times \left(\frac{m_{gel}}{m_{total}}\right) + \rho_{gel} \times \left(\frac{m_{PCL}}{m_{total}}\right)} \quad (2.4)$$

onde ρ_{PCL} e ρ_{gel} são as densidades de cada material e $\frac{m_{gel}}{m_{total}}$ e $\frac{m_{PCL}}{m_{total}}$ as proporções, respectivamente de PCL e de gelatina, na matriz.

O cálculo da porosidade foi efectuado em três amostras de cada tipo de matriz.

3

Apresentação e discussão de resultados

3.1 Obtenção dos parâmetros de produção

A técnica de electrofiação foi usada na produção das matrizes dérmicas. À partida já estavam definidos os polímeros a usar, a sua concentração e o solvente em que seriam dissolvidos.

Antes de iniciar a produção é necessário um estudo prévio de modo a aferir qual a melhor combinação de parâmetros de produção (tensão aplicada, distância agulha-colector e caudal de saída da solução) que permite obter fibras com as características desejadas para a produção das matrizes.

3.1.1 Matrizes PCL:Gelatina

Para a obtenção dos parâmetros de produção deste tipo de matriz, foi seleccionada uma das cinco soluções deste género (PCL e gelatina na mesma solução). Com esta solução, foram estudadas combinações de parâmetros que permitissem obter fibras com as características desejadas. De seguida, tendo em conta esse intervalo, as restantes quatro soluções foram também sujeitas a um estudo, de modo a encontrar uma combinação de parâmetros única e transversal a todas.

De experiências anteriores com ambos os polímeros, verificou-se que as soluções de gelatina, por norma, dão origem a jactos mais instáveis do que as soluções de PCL. Como tal, decidiu efectuar-se o estudo inicial com a solução que apresenta uma maior proporção

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

de gelatina, a solução S10:90. No estudo desta solução foram então testadas as combinações possíveis de tensão (entre 10 e 18kV), distância (entre 20 e 30cm) e caudal (entre 0,2 e 0,4ml/h).

Apesar de grande parte das fibras obtidas nas várias combinações não possuírem defeitos e apresentarem diâmetros e distribuição uniformes, para distâncias acima dos 25cm verificou-se a tendência para a acumulação excessiva de solução na ponta da agulha, durante o processo de electrofiação. Para caudais a partir de 0,4ml/h e tensões abaixo de 12kV, essa tendência manteve-se. Além disso, as deposições obtidas para caudais a partir de 0,4ml/h apresentavam contas ao longo das fibras. Para tensões a partir de 18kV as fibras obtidas também apresentam contas, assim como diâmetros diferentes entre si.

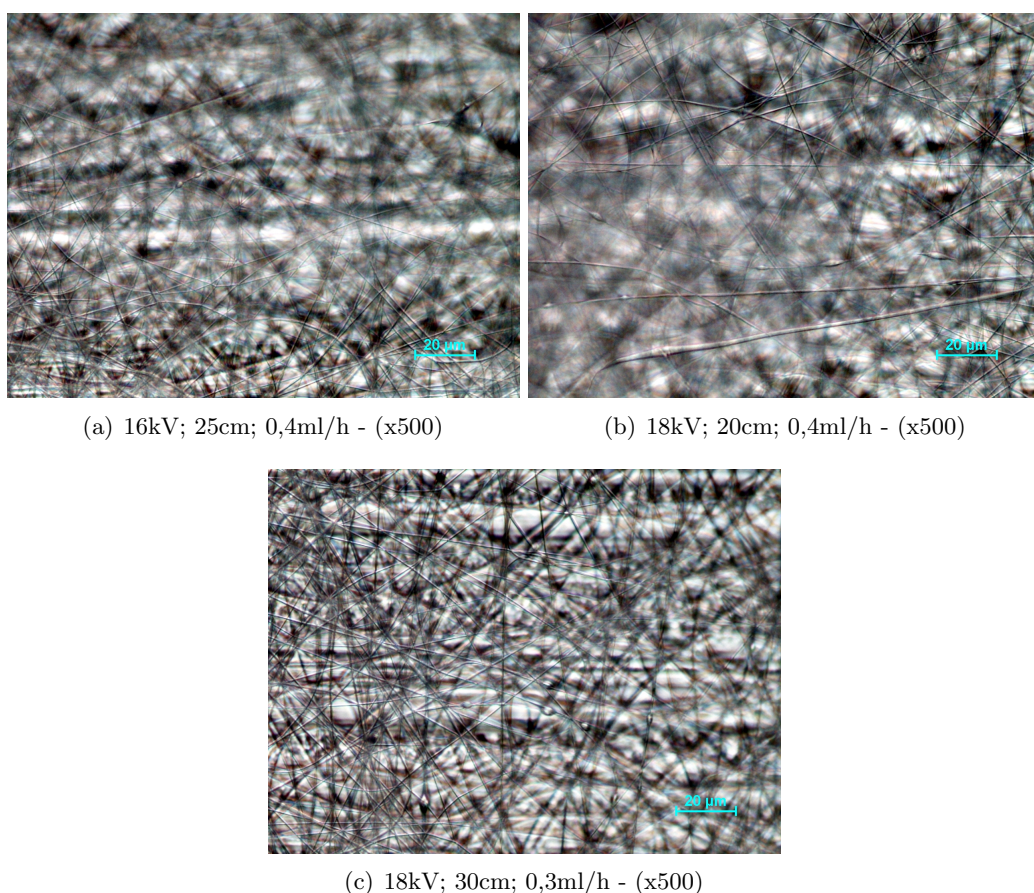


Figura 3.1: Exemplo de defeitos nas deposições da solução S10:90

De seguida, apenas as combinações que derivaram bons resultados, tanto a nível da estabilidade do jacto, como a nível das características das fibras obtidas, foram testadas nas restantes soluções. O novo intervalo de testes foi assim definido para uma tensão entre 12 e 16kV, distância entre 15 e 25cm e caudal entre 0,2 e 0,4ml/h.

Conjugados todos os resultados, foi definido que os parâmetros de electrofiação que melhor se adaptam a todas as soluções, são: uma tensão aplicada de 16kV, um caudal de

0,3ml/h e uma distância agulha-colector de 20cm.

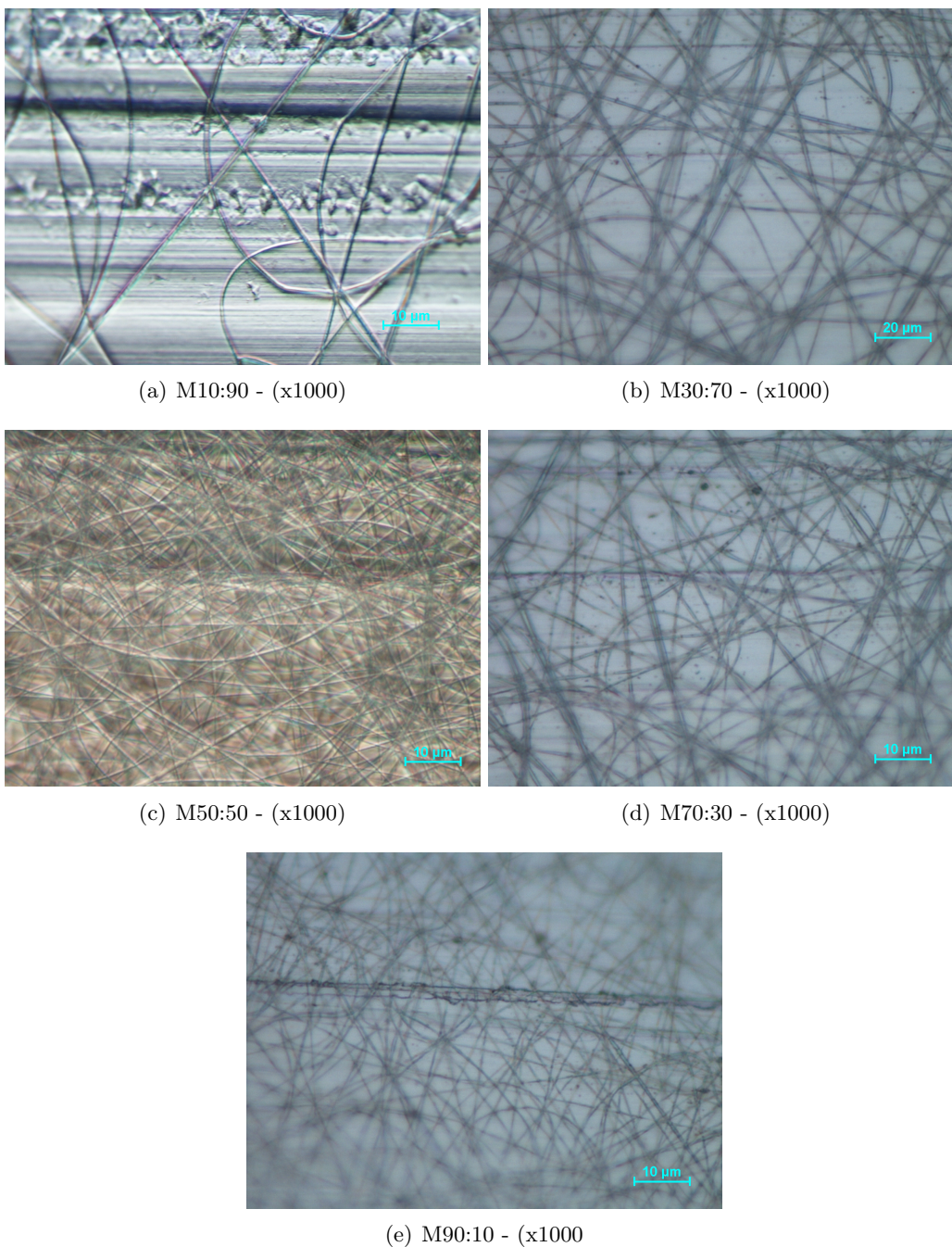


Figura 3.2: Imagens das deposições com os parâmetros escolhidos (16kV; 20cm; 0,3ml/h)

3.1.2 Matriz híbrida PCL+gelatina

A produção desta matriz tem como objectivo obter uma proporção igual de ambos os polímeros mas cada um em fibras separadas. Como tal, para o estudo dos parâmetros de electrofiação, além da qualidade das fibras obtidas é necessário ter em consideração outro aspecto

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

fundamental, garantir que são depositadas quantidades iguais de cada polímero. De modo a respeitar este último ponto, começou-se por estudar qual a combinação de concentração e caudal de cada solução, que iria de encontro ao pretendido. De modo a manter as principais propriedades da solução que influenciam a electrofiação, o solvente usado foi mantido (ácido acético a 95%).

A primeira combinação a ser avaliada foi uma solução de PCL com uma concentração de 20% e uma solução de gelatina com uma concentração de 26%. Para essas concentrações, o caudal necessário para que sejam depositadas as mesmas quantidades de cada polímero é 0,39ml/h para a solução de PCL e 0,3ml/h para a solução de gelatina. De seguida foram estudadas, individualmente para cada uma das soluções, variações de parâmetros de tensão entre 6 e 14kV e de distância agulha-colector entre 10 e 25cm.

Como se pode ver pelas figuras 3.3(a) e 3.3(c), apenas para tensões e distâncias baixas foi possível obter fibras de PCL de qualidade aceitável. Para a solução de gelatina só foram obtidas fibras com boa qualidade para distâncias e tensões maiores, como se pode ver pelas figuras 3.3(b) e 3.3(d).

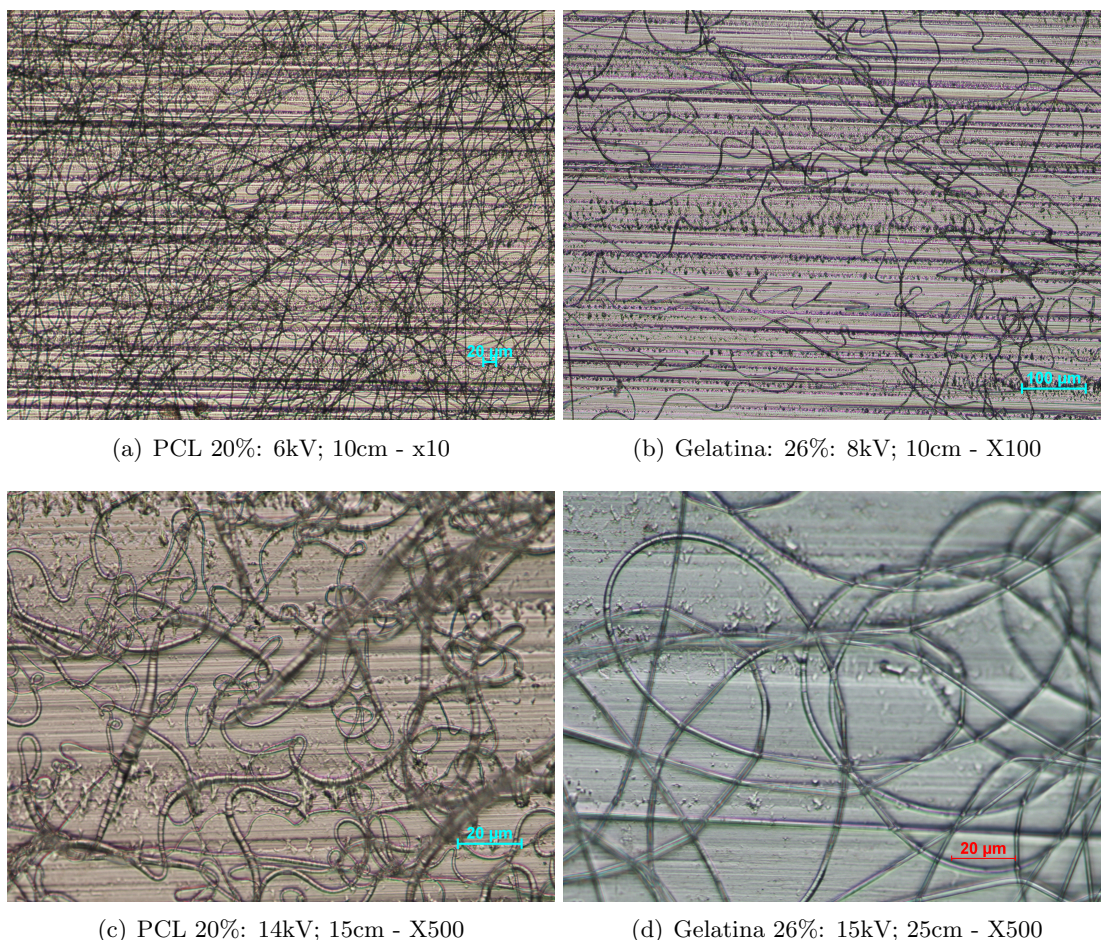


Figura 3.3: Imagens das deposições de PCL a 20% e de gelatina a 20%

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Contudo, verificou-se que o aumento da distância provoca um aumento na largura da deposição de gelatina superior ao aumento na largura da deposição de PCL, ultrapassando-a em alguns centímetros. De modo a manter a proporcionalidade, ambas as larguras têm de ser coincidentes. Logo, esta combinação não serve para o pretendido.

De seguida avaliou-se a possibilidade de uma combinação de ambas as soluções com uma concentração de polímero de 23%. Para tal, as duas soluções foram testadas individualmente e o caudal a que ambas foram fiadas, de modo a manter a proporcionalidade, foi de 0,3ml/h.

De acordo com testes prévios, definiu-se para a solução de gelatina um intervalo de variação de parâmetros entre 13 e 15kV para a tensão e entre 20 e 30cm para a distância. Para a solução de PCL, esses intervalos foram de 10 a 14kV e 20 a 30cm.

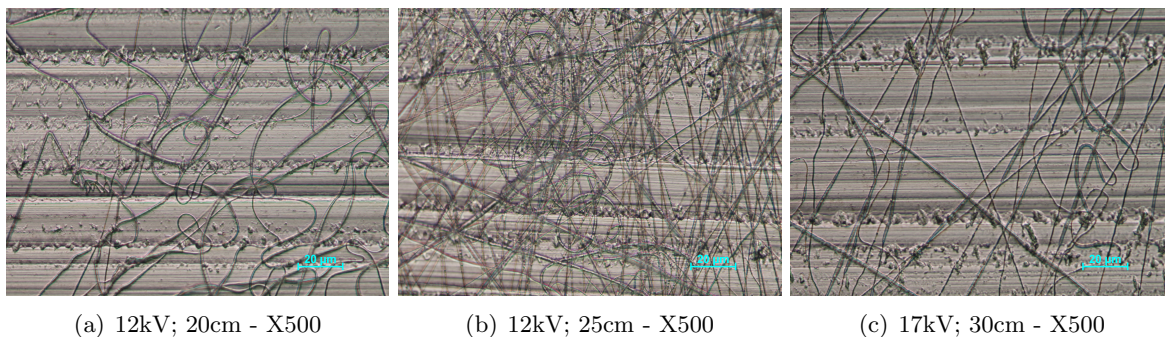


Figura 3.4: Imagens das deposições de PCL a 23%

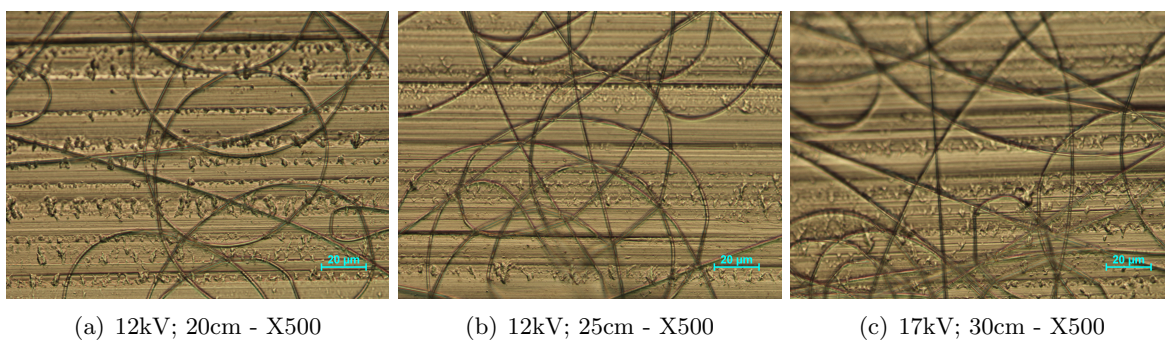


Figura 3.5: Imagens das deposições de gelatina a 23%

Para este intervalo de parâmetros, todas as fibras de gelatina obtidas aparentam ser livres de defeitos e possuem diâmetros uniformes. Contudo as fibras de PCL obtidas apresentam sempre fibras de diâmetros diferentes e/ou contas ao longo das fibras. Como tal, a hipótese de usar esta combinação para a produção da matriz híbrida, foi também descartada.

Na hipótese seguinte, optou-se por diminuir a concentração de polímero em ambas as soluções e verificar o que sucedia para cada solução. Assim, a concentração das soluções

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

de PCL e gelatina passou a ser de 18% e 21%, respectivamente. A condição de proporções iguais obriga a um caudal de 0,35ml/h para a solução de PCL e de 0,3ml/h para a solução de gelatina.

Decidiu-se que a variação de parâmetros seria agora de 10 a 20cm para a distância agulha-colector de ambas as soluções, 8 a 16kV de tensão para o PCL e 7 a 15kV de tensão para a gelatina.

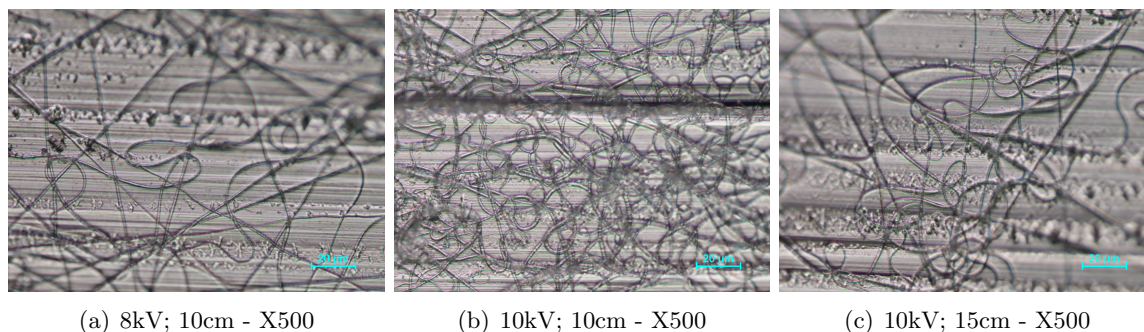


Figura 3.6: Imagens das deposições de PCL a 18%

As fibras de PCL obtidas para uma tensão de 8kV e uma distância de 10cm apresentam uma distribuição uniforme, com diâmetros constantes e sem defeitos, sendo a largura da deposição de cerca de 7/8cm.

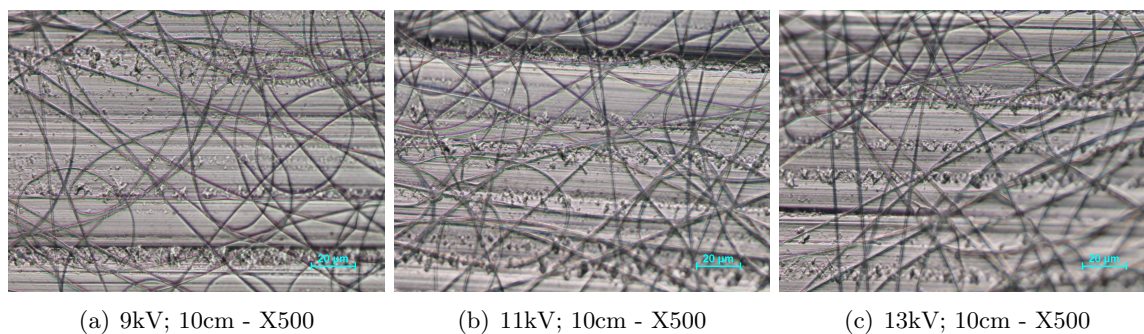


Figura 3.7: Imagens das deposições de gelatina a 21%

No caso da gelatina, as fibras obtidas em todo o intervalo de parâmetros não contêm defeitos e apresentam uma distribuição e diâmetro das fibras uniforme. Contudo, observando a largura das deposições, verifica-se que uma largura semelhante à da deposição de PCL (7/8cm) apenas é obtida usando uma distância de 10cm e tensões entre 9 e 13kV. Esses parâmetros foram então os "candidatos" a passar (juntamente com a distância de 10cm e uma tensão de 6kV definidos para a solução de PCL) para a fase seguinte: electrofiar os dois tipos de fibras em simultâneo.

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Foram feitas então três deposições de ambas as soluções em simultâneo com os parâmetros:

1. PCL: 10cm, 8kV, 0,35ml/h ; Gelatina: 10cm, 11kV, 0,3ml/h
2. PCL: 10cm, 8kV, 0,35ml/h ; Gelatina: 10cm, 9kV, 0,3ml/h
3. PCL: 10cm, 8kV, 0,35ml/h ; Gelatina: 10cm, 13kV, 0,3ml/h

A largura das deposições obtidas, já com os dois tipos de fibras, continua a ser de 7/8cm. Contudo, apesar de em todas estas combinações as fibras obtidas aparentarem ser promissoras, nas combinações 2 e 3 os jactos são instáveis, logo estas combinações foram eliminadas.

É ainda necessário uma observação mais cuidada da primeira combinação, de modo a confirmar a presença de dois tipos de fibras. Uma vez que as deposições foram feitas sobre papel de alumínio, a análise com microscópio óptico não permitiu distinguir convenientemente esses dois tipos. De modo a contornar esse facto, optou-se por fazer uma nova deposição directamente para uma lâmina de vidro (com a combinação de parâmetros 1), de modo a conseguir observar ambas as fibras no microscópio óptico em modo de transmissão (figura 3.8). Numa análise cuidada, verifica-se que são visíveis dois tipos de fibras (umas lisas e outras mais rugosas), confirmando assim que estes parâmetros são os indicados para passar à fase de produção da matriz híbrida (M1+1).

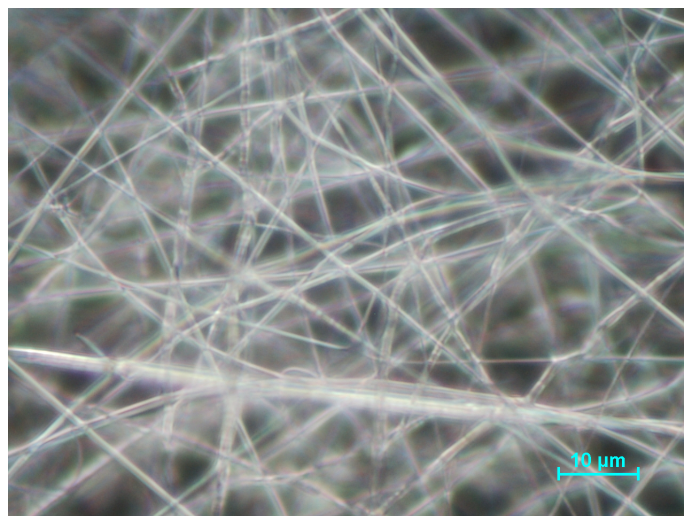


Figura 3.8: Aspecto final da matriz híbrida - x1000

3.2 Caracterização das soluções

3.2.1 Condutividade e Tensão Superficial

Tabela 3.1: Valores obtidos para a condutividade, densidade e tensão superficial

Solução	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Densidade (g/cm^3)	Tensão Superficial (mN/m)
S21Gel	$364,9 \pm 1,1$	1,130	$31,1 \pm 0,5$
S10:90	$306,7 \pm 2,3$	1,104	$30,9 \pm 0,3$
S30:70	$203,6 \pm 1,1$	1,092	$28,7 \pm 0,2$
S50:50	$125,6 \pm 0,5$	1,086	$30,4 \pm 0,1$
S30:70	$14,3 \pm 1,2$	1,075	$30,2 \pm 0,2$
S90:10	$5,1 \pm 0,1$	1,064	$29,6 \pm 0,1$
S18PCL	$1,4 \pm 0,1$	1,056	$28,2 \pm 0,1$

Na tabela 3.1, são apresentados os valores obtidos nas medições efectuadas da condutividade, densidade e tensão superficial das sete soluções usadas na produção das matrizes, assim como o desvio padrão associado às medições.

Relativamente à condutividade, a solução que contém apenas gelatina como soluto, apresenta a maior condutividade de todas as soluções testadas, enquanto que a solução apenas com PCL apresenta a condutividade mais baixa.

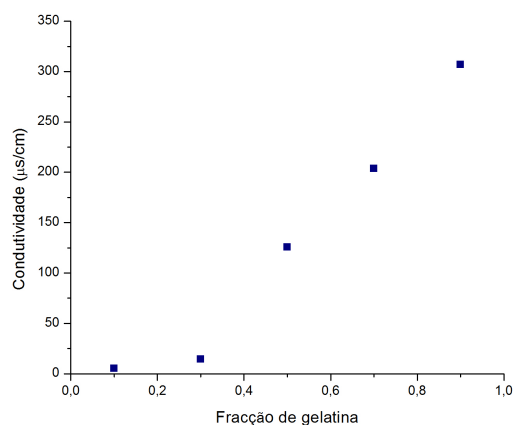


Figura 3.9: Representação da condutividade em função da proporção de gelatina

Os valores referentes às soluções com ambos os polímeros incluídos, confirmam um aumento da condutividade com o aumento da proporção de gelatina, especialmente para concentrações a partir de 50% do total de polímero, como se pode observar na figura 3.9.

De acordo com estes valores, é então esperado que as fibras obtidas no processo de electrospinning, sejam tão mais finas quanto maior a sua proporção de gelatina.

Em relação à densidade, observa-se um ligeiro aumento na densidade das soluções, com a concentração de gelatina. A tensão superficial é aproximadamente igual para todas as soluções. Deste parâmetro apenas se pode aferir, então, que eventuais diferenças nos vários tipos de fibras obtidas não terão como causa a tensão superficial das respectivas soluções.

3.2.2 Reologia

O estudo do comportamento reológico foi efectuado para todas as soluções envolvidas na produção das 6 matrizes em estudo. Os gráficos obtidos da variação da viscosidade de cada solução em função da taxa de corte são apresentados na figura 3.10

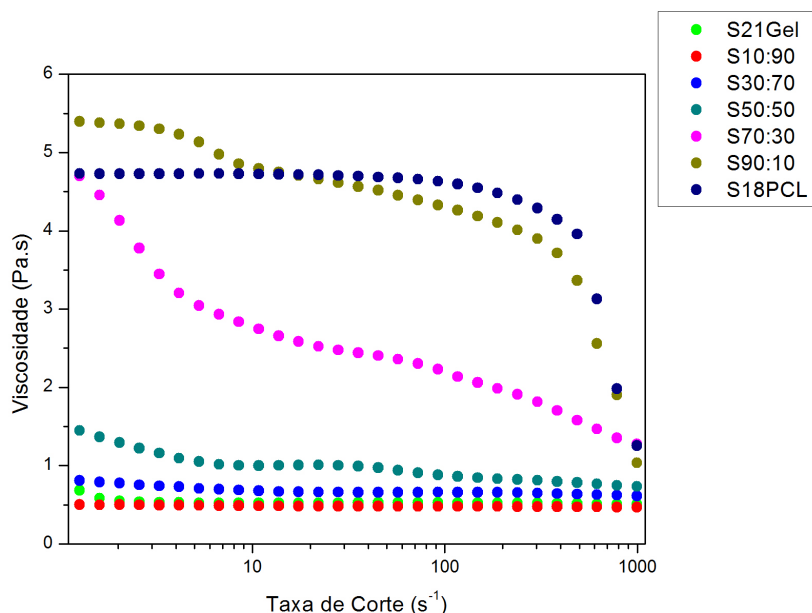


Figura 3.10: Comportamento reológico das soluções usadas

Observando esses gráficos, verifica-se que a solução de PCL utilizada na matriz M1+1 (S18PCL) é cerca de $5\times$ mais viscosa do que a solução de gelatina (S21Gel). Esse facto explica o aumento da viscosidade nas soluções PCL:Gelatina, com o aumento da proporção de PCL em relação à gelatina. Este comportamento coincide com o esperado, uma vez que era já notório aquando do manuseamento das soluções. A solução S90:10 exhibe um comportamento reológico semelhante ao da solução só de PCL, enquanto que as soluções S10:90, S30:70 e S50:50 exibem um comportamento semelhante à solução só de gelatina. Contudo, da solução S50:50 para a solução S70:30 observa-se um aumento brusco da viscosidade, especialmente para taxas de corte mais baixas. Este aumento pode influenciar as fibras da matriz M70:30, obtidas no processo de electrofiação, a exibirem um comportamento diferente do esperado a nível do seu diâmetro.

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Uma vez que todas as soluções são sujeitas a um banho de ultrasons, o comportamento reológico da solução S50:50 foi determinado antes e depois desse banho, de modo a verificar se os ultrasons provocam algum tipo de alteração na viscosidade deste tipo de solução.

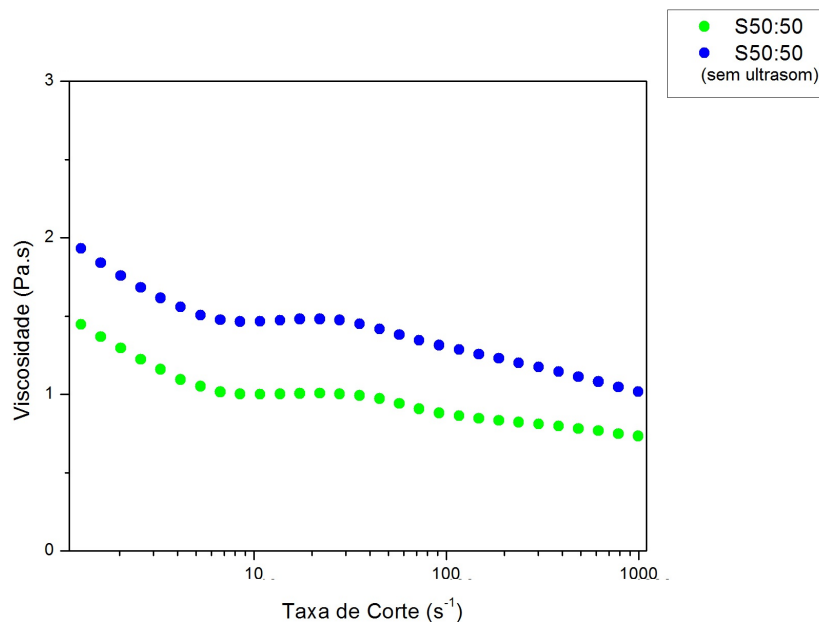


Figura 3.11: Comportamento reológico da solução S50:50 com e sem ultrasons

Pela figura 3.11 observa-se uma ligeira diminuição da viscosidade da solução S50:50, quando sujeita a ultrasons. Uma vez que as soluções com maior proporção de PCL foram sujeitas a este processo durante menos tempo, introduz-se a possibilidade de o aumento brusco de viscosidade da solução M50:50 para a solução M70:30 ser originário, não apenas da proporção dos polímeros, mas também do banho de ultrasons.

3.3 Caracterização das matrizes

3.3.1 Morfologia

3.3.1.1 Antes da reticulação

Matrizes PCL:Gelatina

Na figura 3.12 e na tabela 3.2 encontram-se, respectivamente, as imagens obtidas por SEM da morfologia das cinco matrizes PCL:Gelatina e o diâmetro médio das suas fibras (com o desvio padrão associado às medições). Na figura 3.13 são apresentados os histogramas relativos à dispersão de diâmetros das fibras em cada matriz.

As imagens da figura 3.12 permitem observar que as fibras obtidas não possuem contornos nem outro tipo de defeitos ao longo da sua extensão, como os aglomerados de polímero detectados na parametrização do processo de fiação. Contudo, aliando a essas imagens a informação da tabela 3.2, verifica-se que, ao contrário do esperado atendendo aos valores de condutividade e viscosidade das soluções, o diâmetro das fibras não diminui com o aumento da proporção de gelatina.

Como referido no capítulo 2, o procedimento de ultrasons em si foi utilizado com o intuito de eliminar os aglomerados depositados nas matrizes, mas o tempo a que cada solução é submetida a esse procedimento foi determinado consoante a concentração de cada polímero. Este tempo variou entre 2h (para a solução S90:10) e 4h (para a solução S10:90) de modo a uniformizar os diâmetros das fibras obtidas nas 5 matrizes. Como se pode ver na tabela 3.2, esse objectivo foi atingido para as matrizes M30:70, M50:50 e M90:10. Contudo, a baixa concentração de PCL na matriz M10:90 pode não ter sido suficiente para causar a redução do diâmetro das fibras desta matriz.

Relativamente à matriz M70:30, o facto de o diâmetro médio das suas fibras estar acima do esperado e das mesmas possuírem uma dispersão de diâmetros (tabela 3.2 e figura 3.13(d)) elevada, pode ter explicação no comportamento reológico da solução que lhe deu origem.

Tabela 3.2: Valores obtidos para o diâmetro médio das fibras das matrizes PCL:Gelatina

Matriz	Diâmetro (nm)
M10:90	380 ± 55
M30:70	194 ± 43
M50:50	233 ± 55
M70:30	335 ± 114
M90:10	182 ± 50

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

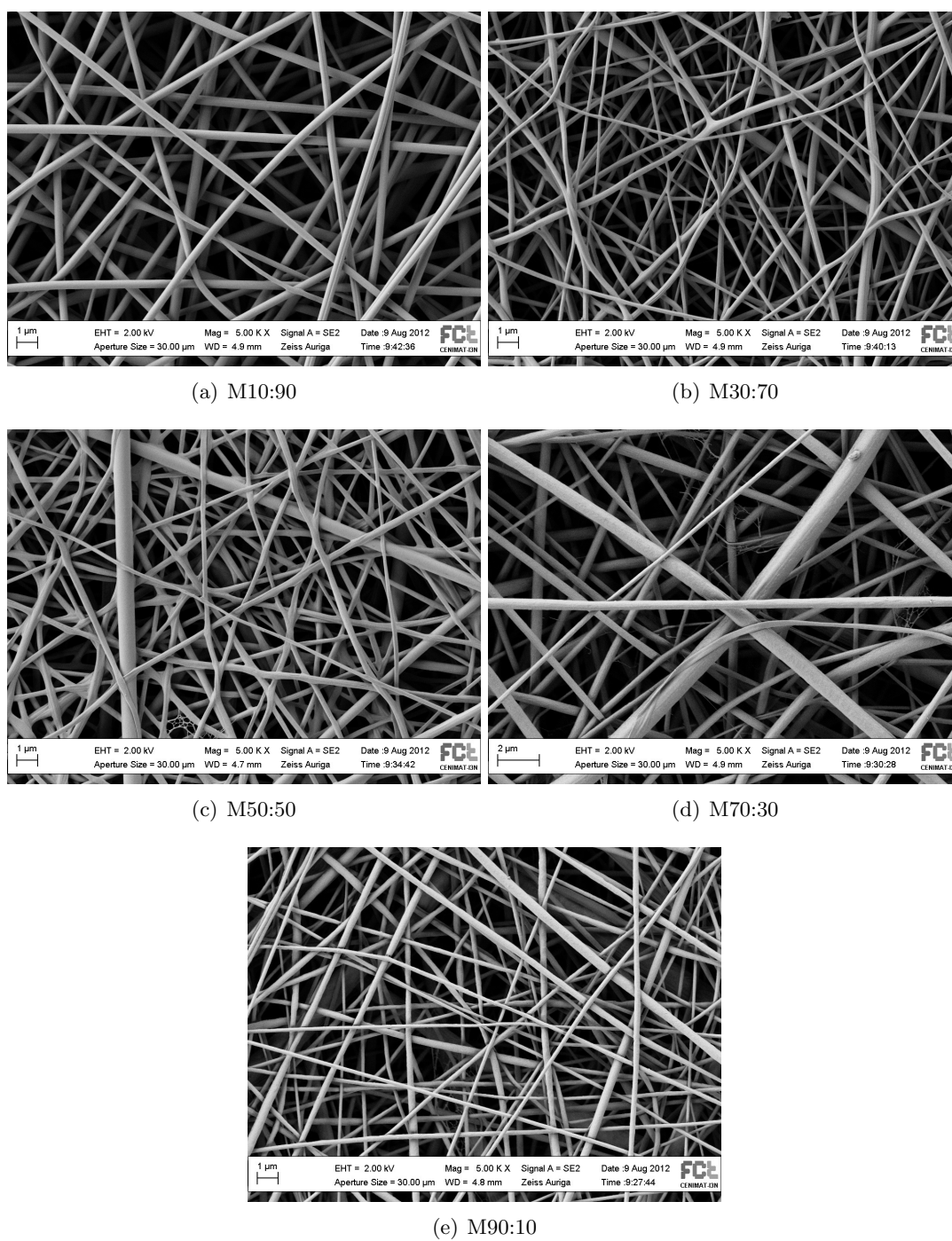
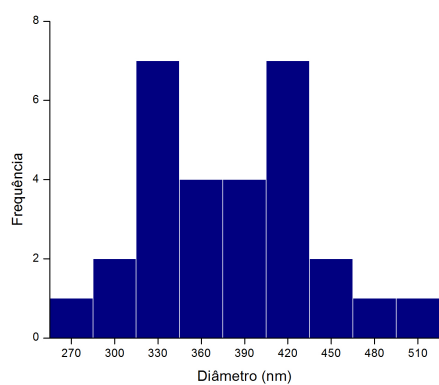
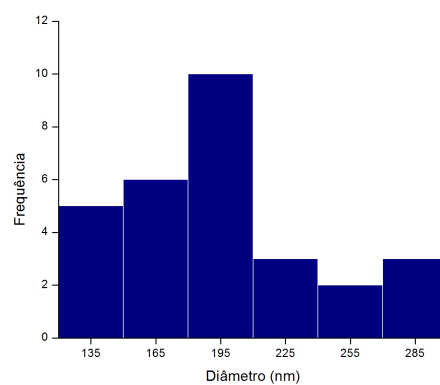


Figura 3.12: Imagens de SEM das matrizes PCL:Gelatina (antes da reticulação) - x5000

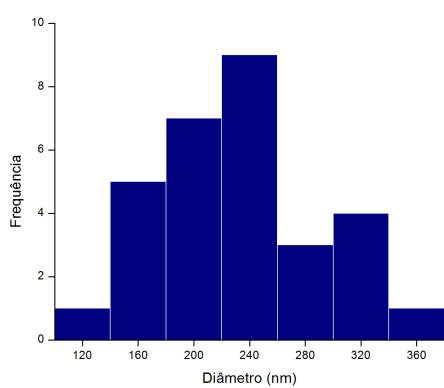
CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS



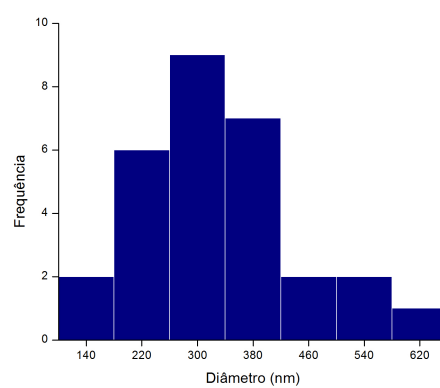
(a) M10:90



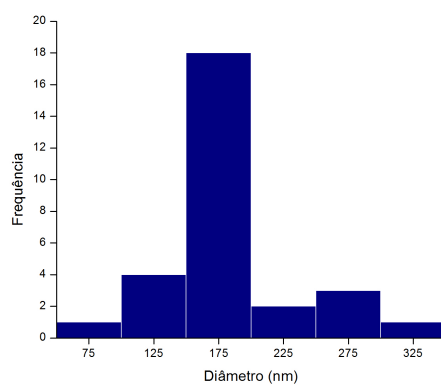
(b) M30:70



(c) M50:50



(d) M70:30



(e) M90:10

Figura 3.13: Histogramas dos diâmetros das fibras que compõem as matrizes PCL:Gelatina (antes da reticulação)

Matriz híbrida PCL+gelatina

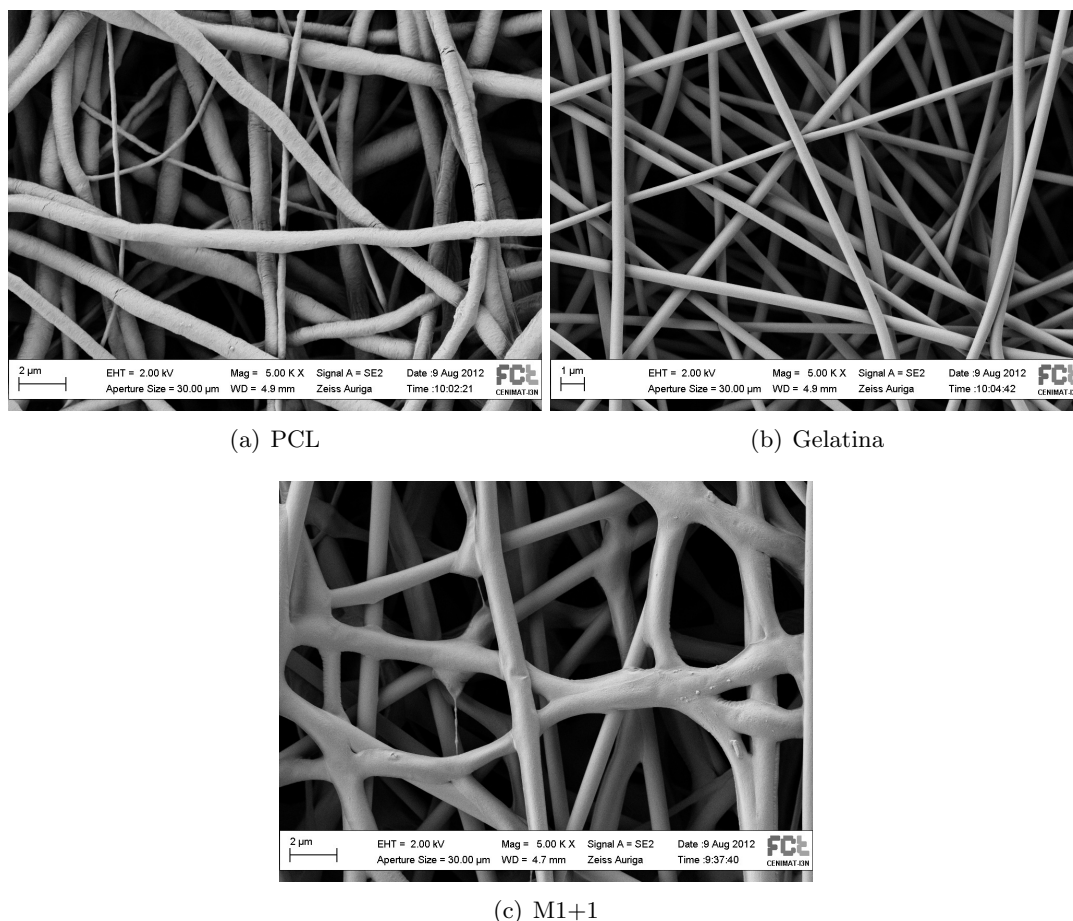


Figura 3.14: Imagens de SEM da matriz M1+1 e dos 2 tipos de fibras que a compõem (antes da reticulação) - $\times 5000$

Relativamente à matriz híbrida PCL+gelatina, nas figuras 3.14 e 3.15, são apresentadas as imagens de SEM da morfologia da matriz M1+1, dos dois tipos de fibras que a constituem e os histogramas relativos à dispersão de diâmetros das fibras associadas. A tabela 3.3 é referente aos diâmetros destas fibras.

Analisando a figura 3.14(a), em conjunto com o histograma respectivo (3.15(a)) verifica-se uma dispersão bimodal dos diâmetros das fibras de PCL. Essa dispersão explica o valor de desvio padrão elevado, associado à medição dos diâmetros (tabela 3.3). É ainda possível observar pequenas fracturas ao longo de algumas das fibras mais grossas. As fibras de gelatina não possuem defeitos ao longo da sua extensão e apresentam um diâmetro uniforme (figuras 3.14(b) e 3.15(b)). Pela tabela 3.3, verifica-se que ambas as fibras constituintes da matriz M1+1 possuem um diâmetro médio semelhante, que se propaga para o diâmetro médio da matriz M1+1.

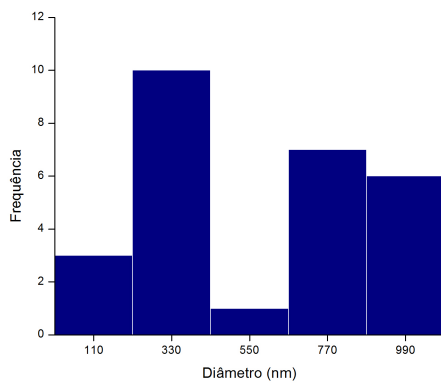
Passando então para a matriz M1+1, na figura 3.14(c) é possível verificar que esta

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

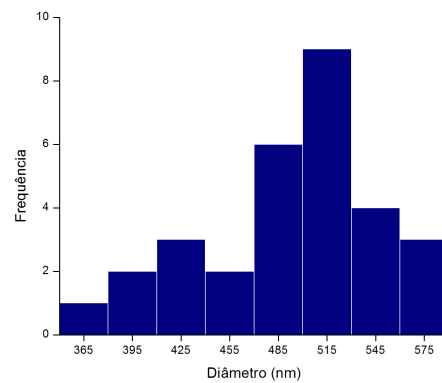
Tabela 3.3: Valores obtidos para o diâmetro médio das fibras matriz M1+1 e das fibras que a compõem

Matriz	Diâmetro (nm)
PCL	553 ± 313
Gelatina	493 ± 57
M1+1	564 ± 103

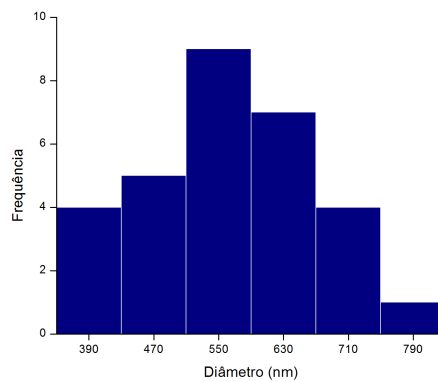
matriz apresenta uma morfologia praticamente sem defeitos, sendo que a conjugação dos dois tipos de fibras elimina os defeitos observados nas fibras de PCL e melhora bastante a dispersão de diâmetros observada nessas fibras (tabela 3.3 e figura 3.15(c)). Um olhar mais atento sobre a figura 3.14(c) revela a presença de dois tipos de fibras diferentes, o que já era esperado.



(a) PCL



(b) Gelatina



(c) M1+1

Figura 3.15: Histogramas dos diâmetros das fibras da matriz M1+1 e dos 2 tipos de fibras que a compõem (antes da reticulação)

3.3.1.2 Após a reticulação

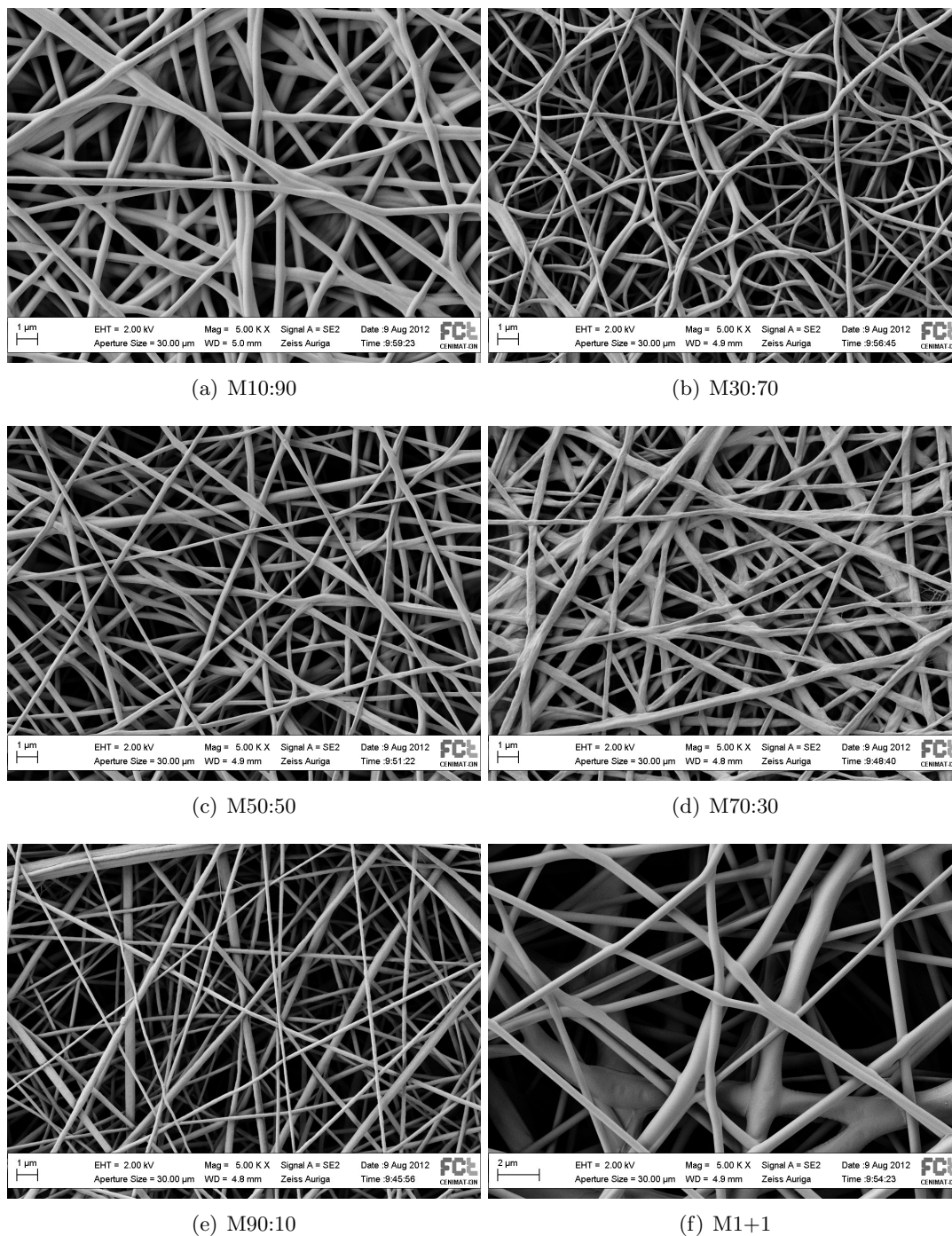


Figura 3.16: Imagens de SEM das matrizes (após a reticulação) - x5000

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

As imagens de SEM das matrizes reticuladas encontram-se na figura 3.16 . Comparando com as matrizes não reticuladas (figuras 3.12 e 3.14(c)), nas matrizes com maior quantidade de gelatina (M10:90, M30:70 e M1+1) as diferenças a nível da morfologia são visíveis, nomeadamente nota-se uma certa agregação entre algumas fibras. Esta ocorrência é devida à dissolução parcial de segmentos de algumas fibras quando as matrizes estão sujeitas ao ambiente extremamente húmido em que decorreu a reticulação[43] e também à coalescência das fibras como resultado do seu inchamento aquando do processo de reticulação.

No geral, o diâmetro das fibras mantém-se semelhante após a reticulação, com a excepção das matrizes M70:30 e M1+1.

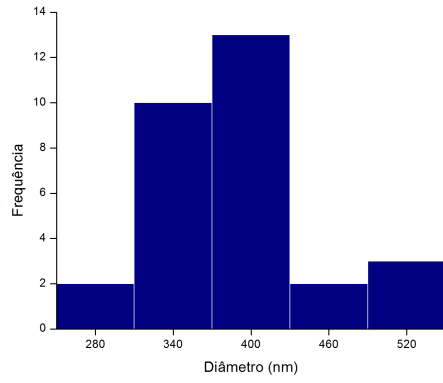
Relativamente à matriz híbrida M1+1, a reticulação das fibras de gelatina provocou uma diminuição de diâmetro das mesmas, levando a uma diminuição do diâmetro médio, contudo, como as fibras de PCL não são afectadas, esta diminuição levou a um ligeiro aumento na dispersão de diâmetros, como se pode verificar na tabela 3.4 e na figura 3.17(f).

As fibras da matriz M70:30 apresentam agora um diâmetro médio semelhante às das restantes matrizes PCL:Gelatina (tabela 3.4), assim como uma dispersão consideravelmente mais uniforme. Além da melhoria na sua resistência à água, esta uniformização a nível de diâmetros, provocada pela reticulação nesta matriz, faz prever uma melhoria nas suas propriedades mecânicas, relativamente à sua análoga não reticulada.

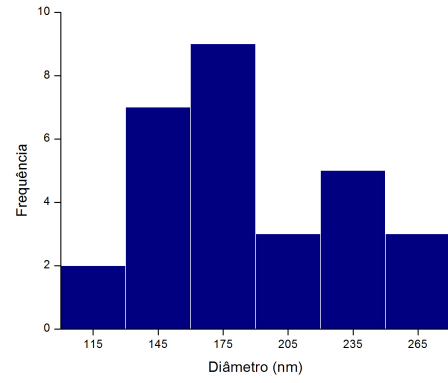
Tabela 3.4: Valores obtidos para o diâmetro médio das fibras das matrizes

Matriz	Diâmetro (nm)
M10:90	390 \pm 59
M30:70	188 \pm 43
M50:50	223 \pm 46
M70:30	248 \pm 67
M90:10	178 \pm 44
M1+1	462 \pm 132

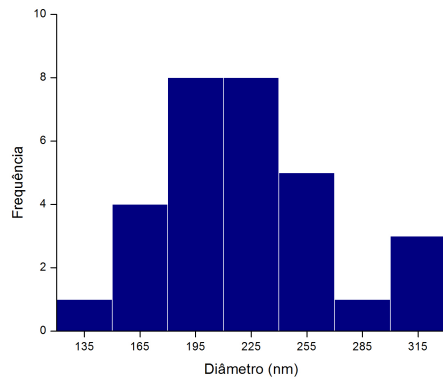
CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS



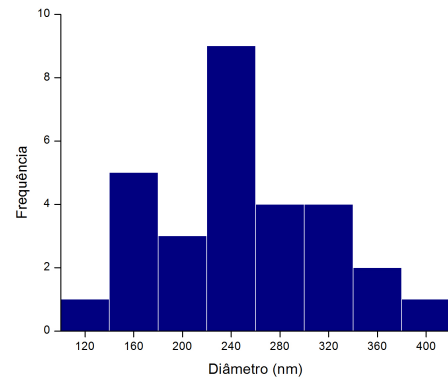
(a) M10:90



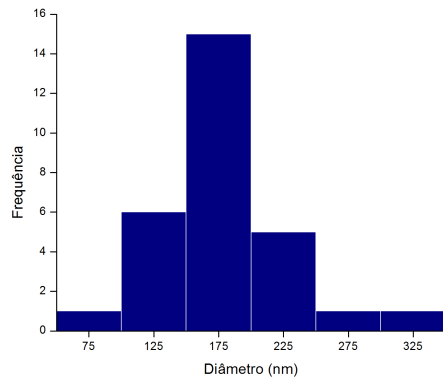
(b) M30:70



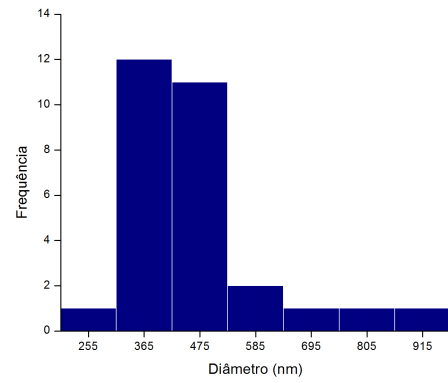
(c) M50:50



(d) M70:30



(e) M90:10



(f) M1+1

Figura 3.17: Histogramas dos diâmetros das fibras que compõem as matrizes (após a reticulação)

3.3.1.3 Após a lavagem

De modo a ficar com uma ideia sobre o comportamento das matrizes e a sua resistência à água, as 5 matrizes reticuladas foram submersas em água destilada e colocadas num agitador orbital durante 3h a uma rotação de 150rpm.

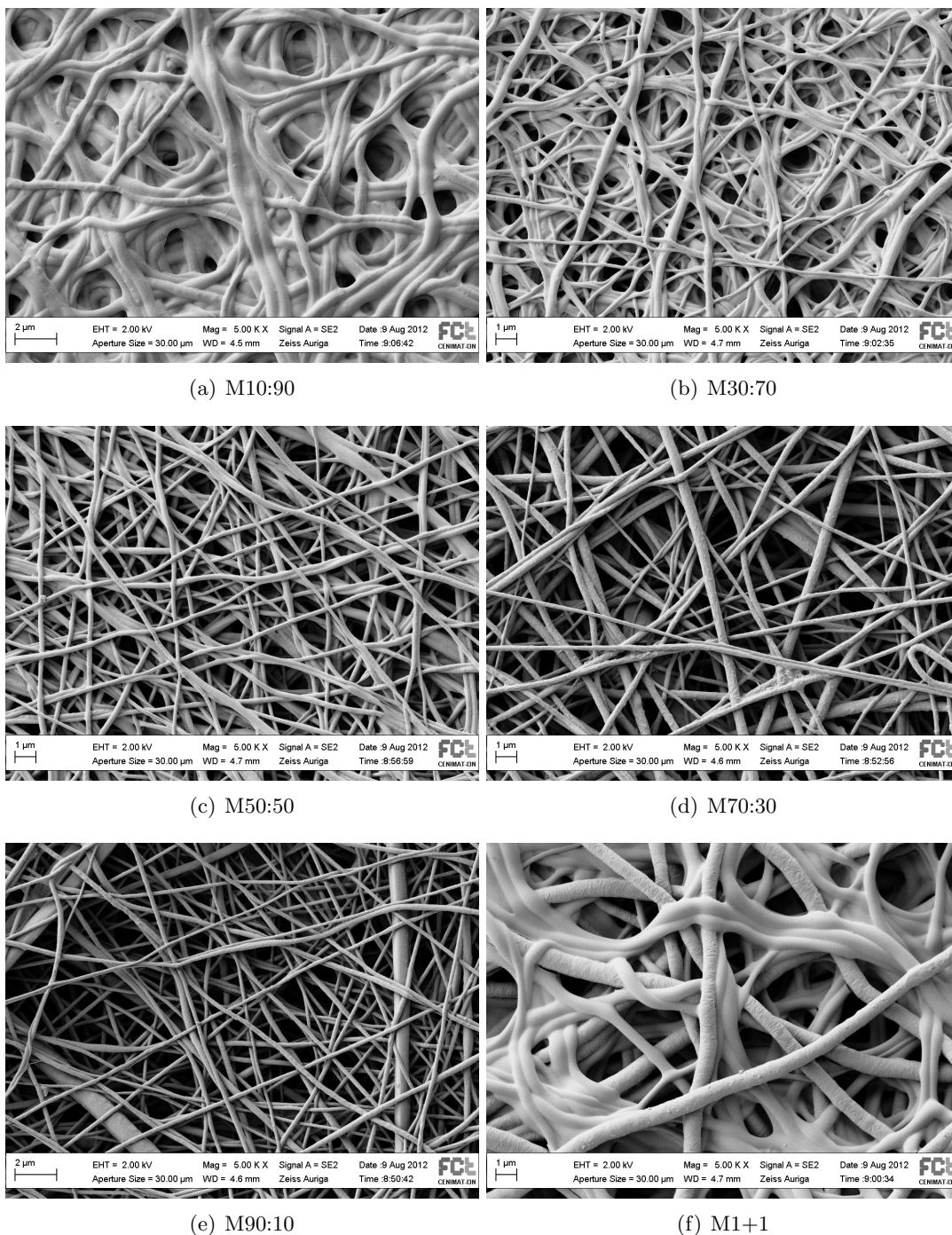


Figura 3.18: Imagens de SEM das matrizes (após lavagem) - x5000

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Essas matrizes foram também analisadas por SEM, cujas imagens são apresentadas na figura 3.18. Como se pode ver pela imagem da matriz M10:90, com o processo de lavagem as fibras desta matriz fundiram. Como tal, para esta matriz não foram efectuadas medições para obter o diâmetro médio das fibras (tabela 3.5), nem o respectivo histograma (figura 3.19).

Como seria de esperar, a matriz M90:10 não sofreu alterações a nível do diâmetro médio das fibras. Contudo, analisando o seu histograma, observa-se uma diminuição da uniformidade de diâmetros das fibras. Tal não é esperado e, provavelmente, esta imagem foi tirada a uma zona não representativa da morfologia desta matriz.

Nas matrizes M50:50 e M70:30 ocorre uma diminuição do diâmetro médio das fibras. A razão desta diminuição é provavelmente o facto de, no processo de lavagem e apesar do processo de reticulação, uma porção da gelatina se ter dissolvido na água. Relembra-se que, uma vez que a gelatina de peixe se dissolve à temperatura ambiente, se estas matrizes não fossem submetidas ao processo de reticulação, esta redução de diâmetro seria substancialmente maior.

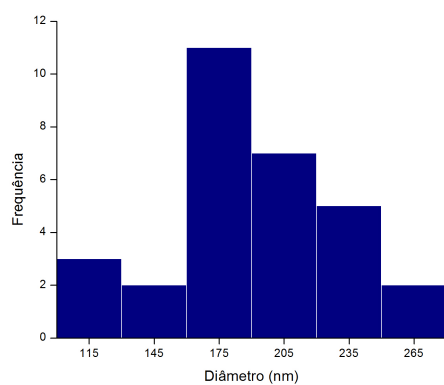
As fibras da matriz M30:70, devido ao seu elevado conteúdo de gelatina, sofrem alguma coalescência quando submetidas à lavagem. Tal facto pode ter influenciado as medições para a obtenção do seu diâmetro médio, uma vez que era esperado que alguma da gelatina fosse lavada e o diâmetro médio diminuísse.

Na matriz M1+1, as fibras de gelatina sofrem o mesmo efeito que na matriz M10:90. Contudo, as fibras de PCL fazem com que essa coalescência só se manifeste em metade das fibras da matriz, conseguindo assim manter um grau de porosidade aparentemente aceitável.

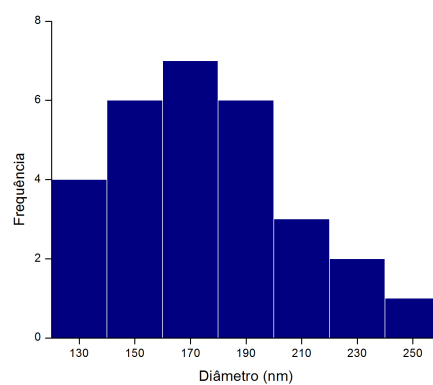
Tabela 3.5: Valores obtidos para o diâmetro médio das fibras das matrizes (lavadas)

Matriz	Diâmetro (nm)
M30:70	190 ± 39
M50:50	175 ± 31
M70:30	206 ± 80
M90:10	182 ± 42
M1+1	583 ± 146

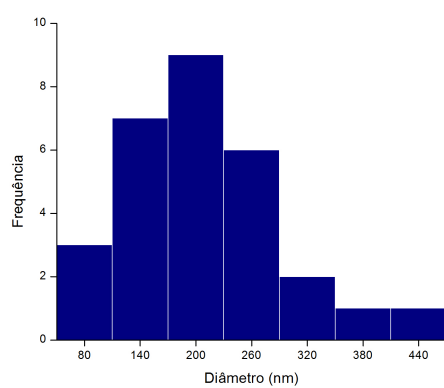
CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS



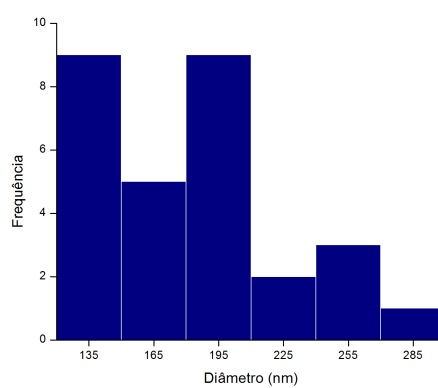
(a) M30:70



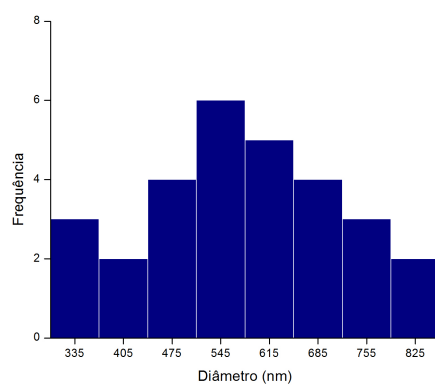
(b) M50:50



(c) M70:30



(d) M90:10



(e) M1+1

Figura 3.19: Histogramas dos diâmetros das fibras que compõem as matrizes (lavadas)

3.3.2 Porosidade

Uma vez que uma eventual aplicação prática das matrizes produzidas neste trabalho, aconteceria apenas em matrizes reticuladas, foi medida a porosidade das mesmas. Esta medição, assim como respectivo desvio padrão associado, estão resumidos na tabela 3.6. De acordo com a bibliografia, de modo a permitir a penetração de células no seu interior, as matrizes deste tipo devem possuir uma porosidade entre os 60 e os 90%[44][40]. Analisando a tabela 3.6, verifica-se, com a excepção da matriz M10:90, que as matrizes estão todas dentro desse intervalo. Esta tabela revela também uma diminuição da porosidade, para percentagens de gelatina nas fibras iguais ou superiores a 50%. Olhando novamente para as imagens de SEM das matrizes reticuladas (figura 3.16), não aparenta existir uma grande discrepância a nível de porosidade das matrizes. Contudo, as imagens por SEM são bidimensionais e apenas da superfície das matrizes. Imagens de um corte lateral das matrizes permitiriam aferir sobre a porosidade no interior da amostra e provavelmente perceber o porquê desta redução da porosidade. O processo de reticulação a que as matrizes foram submetidas, faz com que estas contraíam. Uma vez que, para evitar esse efeito, foram usados os anéis de cobre referidos no capítulo 2 (figura 2.8(b)), essa restrição a nível do comprimento e da largura provavelmente transferiu o efeito de contracção para a espessura da matriz, tornando-a mais fina. De facto, medindo a espessura das matrizes, verifica-se que as matrizes com maior conteúdo de gelatina, são as que possuem menor espessura. Tal facto é ainda suportado pela literatura[43].

Tabela 3.6: Valores obtidos para a porosidade das matrizes

Matriz	Porosidade (%)
M10:90	55 ± 2
M30:70	59 ± 4
M50:50	79 ± 1
M70:30	89 ± 1
M90:10	88 ± 1
M1+1	88 ± 2

3.3.3 Ensaios de tracção

As propriedades mecânicas desempenham um papel importante na qualidade de uma matriz para aplicações biomédicas, uma vez que deve possibilitar o manuseamento e ajustar-se à forma do local anatómico. Sabe-se também que as células são sensíveis à rigidez do material. Na figura 3.20 são apresentados os gráficos de tensão versus deformação resultantes dos ensaios de tracção efectuados às matrizes. Deles foram retirados as propriedades mecânicas de cada matriz: o módulo de Young, a tensão de ruptura e a deformação sofrida até à ruptura. Essas propriedades estão agrupadas na tabela 3.7.

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Tabela 3.7: Propriedades mecânicas das matrizes

Matriz	Módulo (Mpa)	Tensão Fratura (Mpa)	Deformação (%)
M10:90	264 ± 56	10,4 ± 2,0	36 ± 14
M30:70	245 ± 61	9,6 ± 1,4	29 ± 9
M50:50	116 ± 37	5,6 ± 1,6	76 ± 14
M70:30	29 ± 3	2,8 ± 0,5	160 ± 54
M90:10	19 ± 3	5,1 ± 0,5	118 ± 21
M1+1	52 ± 11	2,0 ± 0,3	73 ± 16

Como referido na introdução, o módulo de Young indica a rigidez de um material. Os valores obtidos confirmam que um aumento da proporção de gelatina nas matrizes provoca também um incremento desse parâmetro. Contudo, este aumento não se deve à gelatina em si, mas ao processo de reticulação a que as matrizes foram submetidas. Neste processo, o glutaraldeído origina formação de ligações covalentes a nível inter e intramolecular[45][38]. Estas ligações afectam a estabilidade estrutural da gelatina e, conseqüentemente, das matrizes, provocando um aumento do módulo de Young, da sua tensão à ruptura e uma diminuição da deformação sofrida pelo material antes da ruptura. Olhando para estes dois últimos parâmetros na tabela 3.7, confirma-se a tendência de um aumento da tensão de ruptura, com o aumento da quantidade de gelatina nas matrizes, assim como uma diminuição da deformação máxima que cada tipo de matriz suporta, revelando portanto, uma deformabilidade e flexibilidade cada vez menor. Entre as matrizes PCL:Gelatina, a única que foge a esta tendência é a matriz M70:30, que, para uma tensão menor, acaba por sofrer uma deformação ainda maior do que a matriz M90:10. Relembrando a análise morfológica desta matriz, verificou-se que, antes da reticulação, o diâmetro médio das suas fibras era superior ao esperado, tendo sofrido uma redução de cerca de 25% após esse processo. Por um lado, esta variação de diâmetro pode ser a explicação da diferença nas propriedades mecânicas desta matriz, relativamente às restantes.

Comparando as matrizes M50:50 e M1+1, verifica-se que o módulo de Young desta última é cerca de metade do da matriz com a mesma proporção de polímeros, mas só um tipo de fibra. Observando a tabela 3.7, confirma-se que a matriz M1+1 é mais elástica e flexível do que a matriz M50:50, uma vez que, para obter uma deformação semelhante, a matriz M1+1 precisa de menos de metade da tensão aplicada à matriz M50:50. Uma explicação para esta diferença de comportamento entre as duas matrizes, está no facto de a matriz M1+1 possuir dois tipos de fibras diferentes. Pela tabela 3.7 é possível extrapolar que fibras de gelatina toleram pouca deformação, sofrendo ruptura mais cedo do que fibras de PCL.

De acordo com a literatura[15, 46], o módulo de Young da pele está compreendido entre os 60 e os 80 MPa. Já a tensão máxima que este tecido suporta, está compreendida entre os 17 e os 20 Mpa. Essa tensão causa uma deformação entre 54 a 75% do seu comprimento inicial. Perante estes valores, nenhuma das matrizes testadas encaixa neste perfil, uma vez que em

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

todas, a tensão à ruptura suportada é inferior à do órgão cujas lesões se pretende regenerar. Além disso, uma membrana mais fraca (com um baixo valor de tensão de ruptura) pode não resistir ao manuseamento por parte do cirurgião. Relativamente aos outros dois parâmetros, apenas a matriz M1+1 cumpre os requisitos necessários para um substituto dérmico, a nível das propriedades mecânicas. Contudo, todos os ensaios de tracção foram efectuados em matrizes reticuladas, não hidratadas. Da literatura[45], sabe-se que, ao ser hidratada, a gelatina reticulada sofre uma redução drástica do seu módulo de Young, revelando ainda características de flexibilidade e elasticidade semelhantes às da pele no seu estado normal. Infelizmente, o equipamento disponível não permitiu o teste das propriedades mecânicas das matrizes hidratadas. Contudo, verificou-se que realmente, ao serem hidratadas, a maioria das matrizes sofre um aumento notável a nível da sua flexibilidade, elasticidade e capacidade de adesão à pele. Assim, apenas com base nas propriedades mecânicas das matrizes obtidas, nenhuma delas pode para já ser excluída da avaliação do seu potencial para actuar como um substituto dérmico.

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

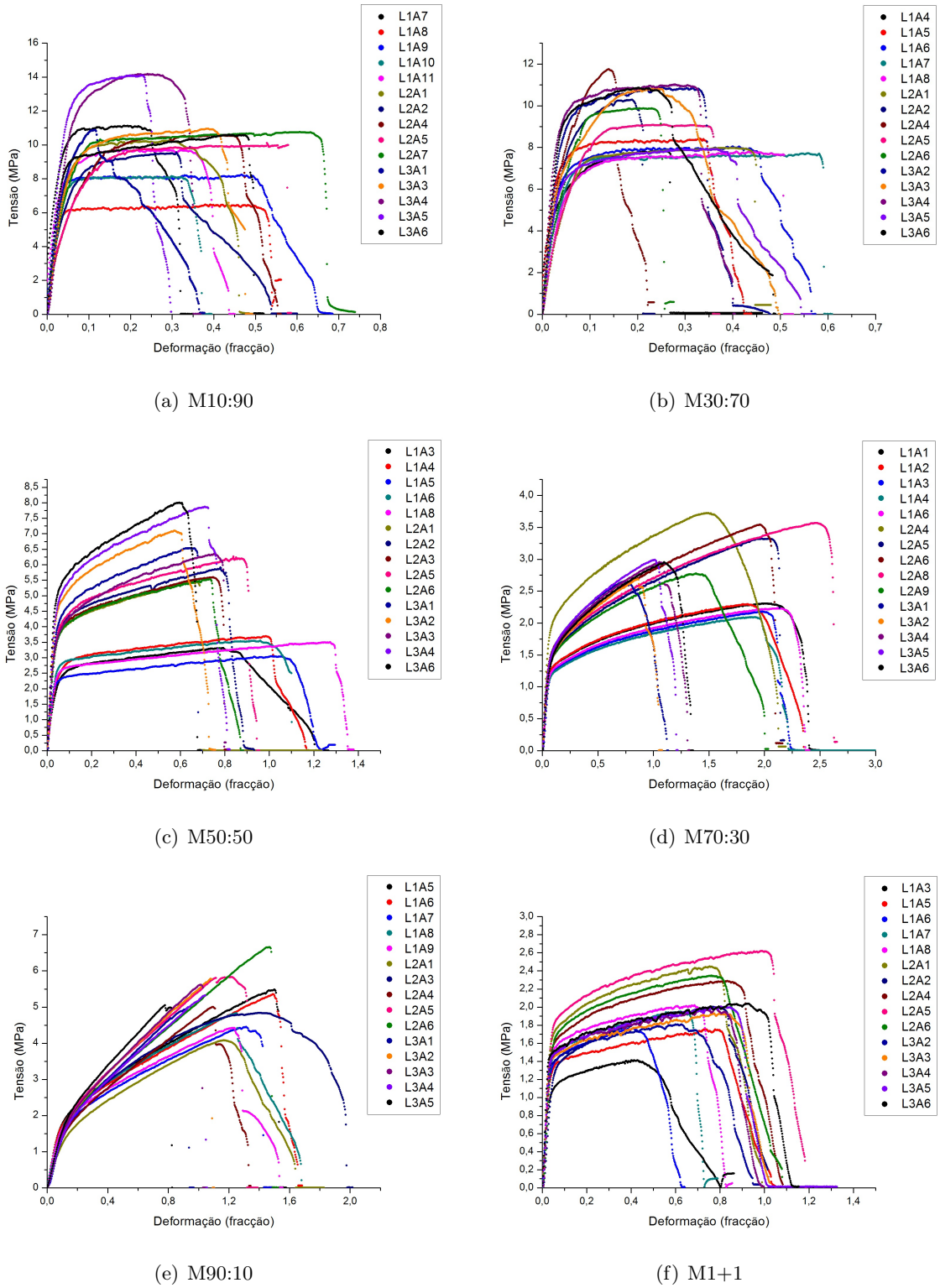


Figura 3.20: Gráficos de tensão versus deformação das matrizes

3.3.4 Ângulo de contacto

Da literatura [31][47], sabe-se que a modificação de fibras de PCL com gelatina, tende a reduzir para zero o ângulo de contacto das matrizes. Como tal, o mesmo é esperado nas matrizes produzidas neste trabalho. A única matriz onde foi possível obter um valor de ângulo de contacto, foi na matriz M90:10, onde a gota, ao cair sobre a matriz, adquire uma forma convexa, como é possível ver na figura 3.21, e cujo ângulo de contacto medido foi de (139 ± 3) graus. A proporção de gelatina nesta matriz é demasiado pequena para compensar a hidrofobicidade do PCL. Nesta matriz, verifica-se ainda que a reticulação não afecta o seu ângulo de contacto, uma vez que das medições se obteve um valor de (140 ± 4) graus.

Já nas restantes matrizes, independentemente de estarem reticuladas ou não, assim que a gota era colocada sobre a matriz, era absorvida praticamente de imediato (como se pode observar no exemplo da matriz M10:90 na figura 3.22), indicando que para proporções de gelatina de peixe acima de 30%, as matrizes são altamente hidrofílicas.

Nos ensaios *in vivo*, observou-se que as matrizes de PCL apresentam dificuldades na adesão à lesão, sendo necessário suturar a matriz à pele de modo a conseguir mantê-la no local. Por outro lado, assim que as matrizes de gelatina são colocadas sobre a lesão, estas aderem de imediato, não sendo necessário recorrer a suturas nem agrafos para manter a matriz no local desejado. A hidroflicidade de uma matriz é, assim, importante na criação de um substituto dérmico, uma vez que matrizes hidrofílicas demonstram uma maior capacidade de adesão a uma lesão, do que matrizes hidrofóbicas.



Figura 3.21: Gotas sobre matriz M90:10

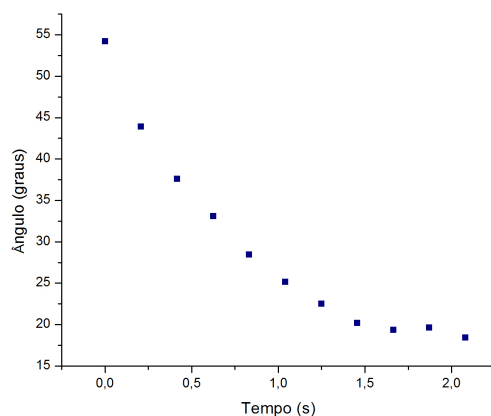


Figura 3.22: Gráfico ângulo versus tempo para uma gota de água colocada sobre a matriz M10:90

3.3.5 FTIR-ATR

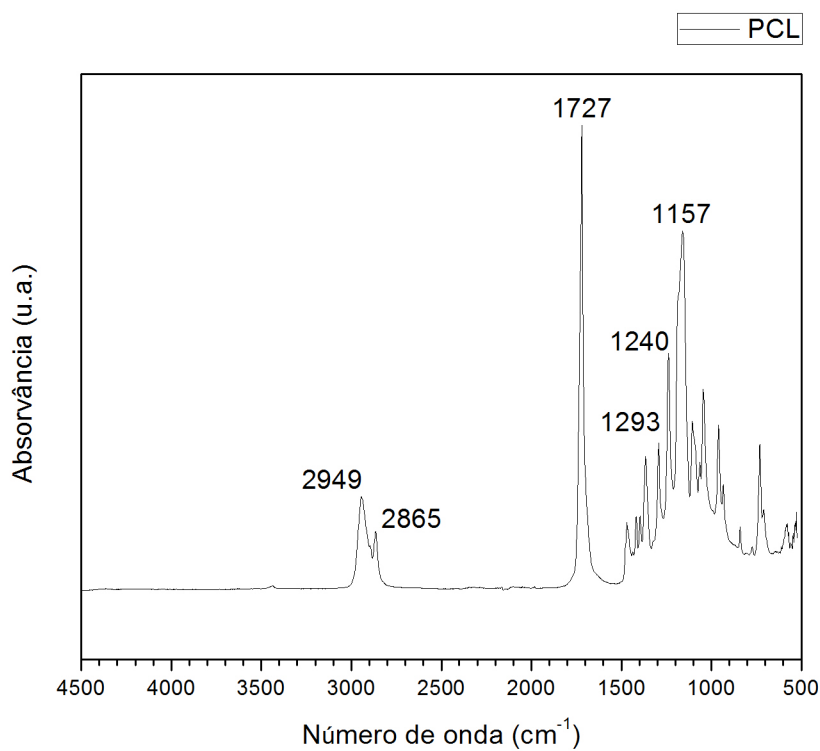


Figura 3.23: Espectro FTIR do PCL

Uma vez que estamos perante matrizes constituídas por dois polímeros diferentes, é necessário analisar individualmente cada polímero, para posteriormente poder comparar as

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

várias matrizes. Tendo em conta que é efectuado um tratamento de reticulação, posterior à electrofiação das matrizes, a análise FTIR permite verificar se esse tratamento afecta a estrutura da gelatina.

Tabela 3.8: Valores dos picos do espectro do PCL

Vibração	Número de onda associado (cm^{-1})	Referências
Estiramento assimétrico CH ₂	2949	[39, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54]
Estiramento simétrico CH ₂	2865	[39, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54]
Estiramento C=O	1727	[39, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54]
Estiramento C-O e C-C (fase cristalina PCL)	1293	[39, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54]
Estiramento assimétrico C-O-C	1240	[39, 48, 49, 50, 51, 52, 53]
Estiramento C-O e C-C (fase amorfa PCL)	1157	[51, 52, 53, 54]

Na figura 3.23, é possível observar o espectro obtido por FTIR do PCL. Na tabela 3.8, estão listadas as vibrações típicas produzidas pelo estiramento das ligações atribuídas ao PCL, assim como o número de onda a que ocorrem. De modo a entender melhor as conclusões retiradas sobre a estrutura deste polímero, recomenda-se uma nova observação da figura 1.4. No espectro do PCL são então visíveis bandas associadas a este polímero nos 2949 cm^{-1} (referente ao estiramento assimétrico de CH₂) e nos 2865 cm^{-1} , (referente ao estiramento simétrico de CH₂). Destaca-se também o pico característico do PCL aos 1727 cm^{-1} , relativo ao estiramento da ligação C=O. Este pico revela a presença dos grupos carbonilo existentes neste polímero, associados às suas ligações éster [37], um facto útil, uma vez que um dos mecanismos de degradação do PCL, é por hidrólise dessas mesmas ligações. A presença da ligação C-O-C é confirmada através do pico aos 1240 cm^{-1} , atribuído à vibração provocada pelo seu estiramento assimétrico. A primeira etapa na degradação de um biopolímero ocorre com a penetração e difusão das moléculas de água nas regiões amorfas do material [55]. O pico aos 1157 cm^{-1} é atribuído ao estiramento das ligações C-O e C-C do polímero em fase amorfa. Já o pico aos 1293 cm^{-1} revela essas mesmas ligações mas em fase cristalina, sendo que relativamente ao representativo da fase amorfa, este pico é de menor intensidade.

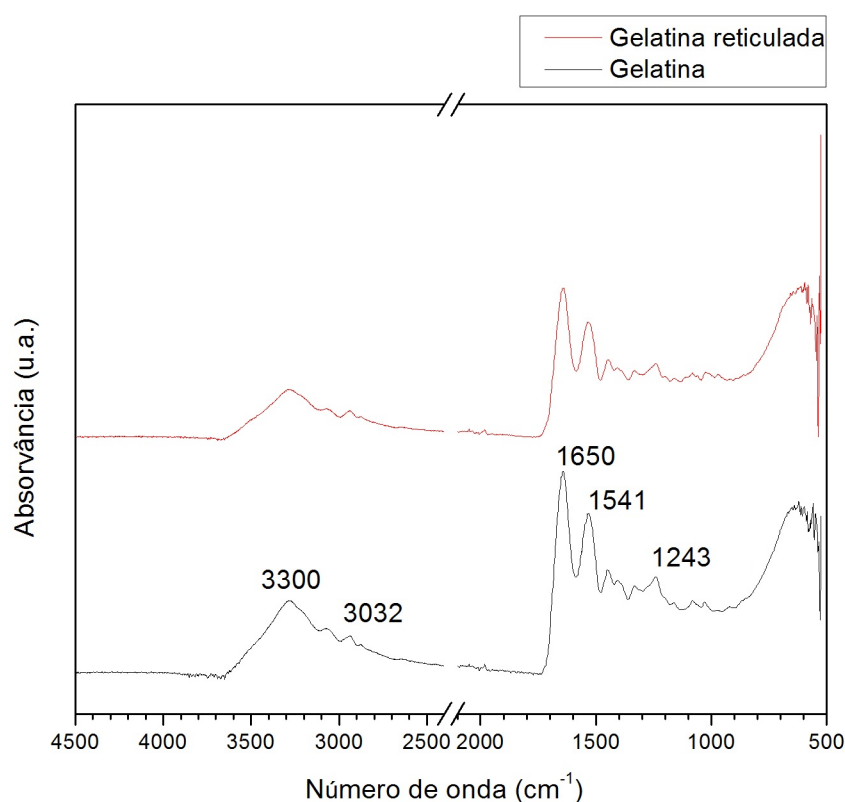


Figura 3.24: Espectro FTIR da gelatina e da gelatina reticulada

Tabela 3.9: Valores dos picos do espectro da gelatina

Vibração	Número de onda associado (cm^{-1})	Referências
Estiramento N-H	3300	[56, 57]
Estiramento C-H	3032	[49, 58]
Deformação angular N-H e estiramento C-N	1541	[37, 39, 48, 49, 56, 57, 58, 59]
Estiramento C=O	1650	[37, 39, 48, 56, 57, 59]
Deformação angular N-H Torção C-N/	1243	[48, 56, 58, 60]
Grupos funcionais CO-NH	620	[61, 62, 63]

Relativamente ao espectro da gelatina (figura 3.24), estão listadas na tabela 3.9 as bandas tipicamente associadas a proteínas. A gelatina é um composto proteico e como tal é composta por aminoácidos ligados entre si por ligações amida, que no FTIR geram bandas de absorção características. A banda na zona dos 3300 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação N-H e é designado por amida A. A banda nos 3032 cm^{-1} é referentes ao estiramento de ligações C-H, sugerindo também, em conjunto com as outras bandas, a presença de grupos amida. O pico aos 1650 cm^{-1} é designado por amida I e representa o estiramento da ligação

C=O. Este pico é importante na análise FTIR da gelatina, uma vez que é atribuído a estruturas proteicas secundárias (neste caso, uma estrutura secundária com configuração alfa-hélice, como é o caso da gelatina)[48]. Os pico em 1541 cm^{-1} , referente à deformação angular das ligações N-H e estiramento da ligação C-N, é designado de amida II, enquanto que o pico a 1243 cm^{-1} é atribuído à deformação angular dos grupos N-H, e é designado por amida III. A amida III revela a estrutura em tripla hélice da gelatina, uma estrutura semelhante à da principal proteína estrutural encontrada na ECM, o colagénio. Este tipo de estrutura é extremamente favorável à adesão e proliferação celular[58]. Finalmente, a banda visível aos 620 cm^{-1} designa-se por amida V, e corresponde à torção de ligações C-N e à presença de grupos funcionais CO-NH, sendo consistente com a presença das cadeias peptídicas principais (protein backbone) da gelatina.

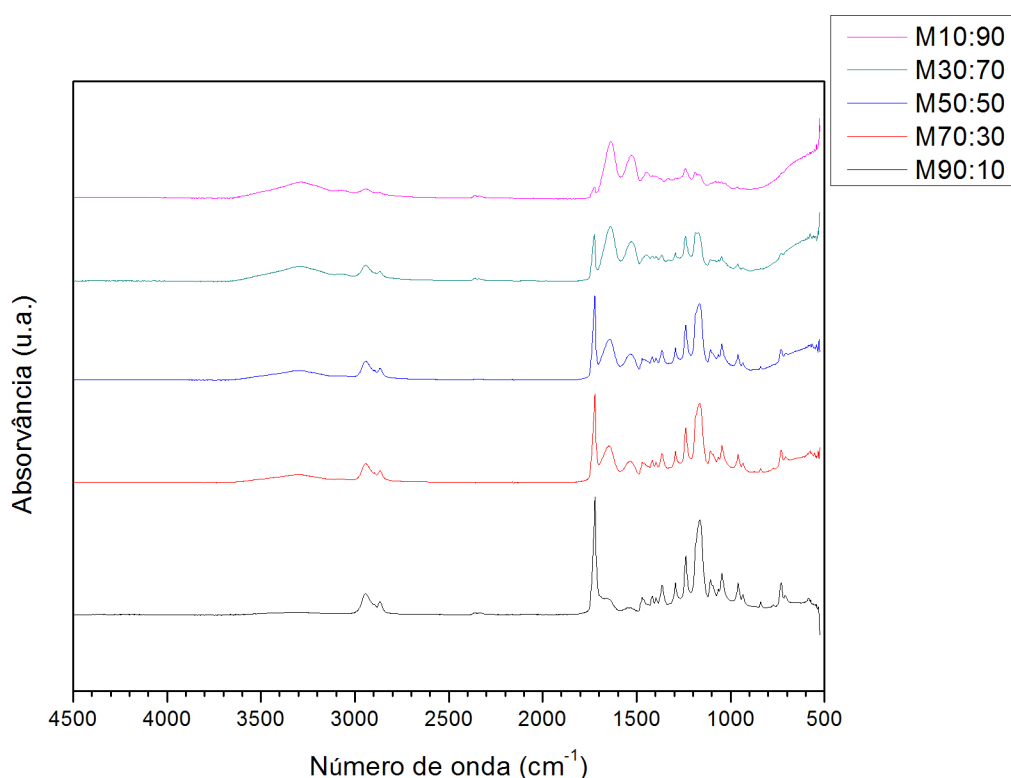


Figura 3.25: Espectro FTIR de todas as matrizes

Na figura 3.24 está também incluído o espectro da gelatina reticulada. Ambos os espectros nesta figura são idênticos e contêm as mesmas bandas características. O espectro da gelatina reticulada continua a apresentar o pico designado por amida III (1243 cm^{-1}), podendo-se assim concluir que o processo de reticulação não provoca alterações na estrutura química da gelatina, pelo menos, alterações que influenciem negativamente a adesão e proliferação celular nas matrizes.

Uma vez analisados ambos os polímeros em separado, e concluído que a reticulação

não influencia negativamente a estrutura química das matrizes, é agora possível partir para a análise dos espectros FTIR obtidos para as mesmas (figura 3.25).

Começando pelo espectro da matriz M90:10, verifica-se que este é muito semelhante ao do PCL puro, sendo visível a forte presença dos picos característicos em 2949 cm^{-1} , 2865 cm^{-1} , 1727 cm^{-1} e 1157 cm^{-1} . Neste espectro é já possível observar uma pequena banda em 1650 cm^{-1} referente à amida I. Analisando os restantes espectros, verifica-se que um aumento na proporção de gelatina nas matrizes, provoca uma diminuição na intensidade dos picos característicos do PCL. Como seria de esperar, esse aumento de proporção causa também um incremento na intensidade dos picos associados à gelatina, como é o caso das amidas A (3300 cm^{-1}), I (1650 cm^{-1}) e II (1541 cm^{-1}).

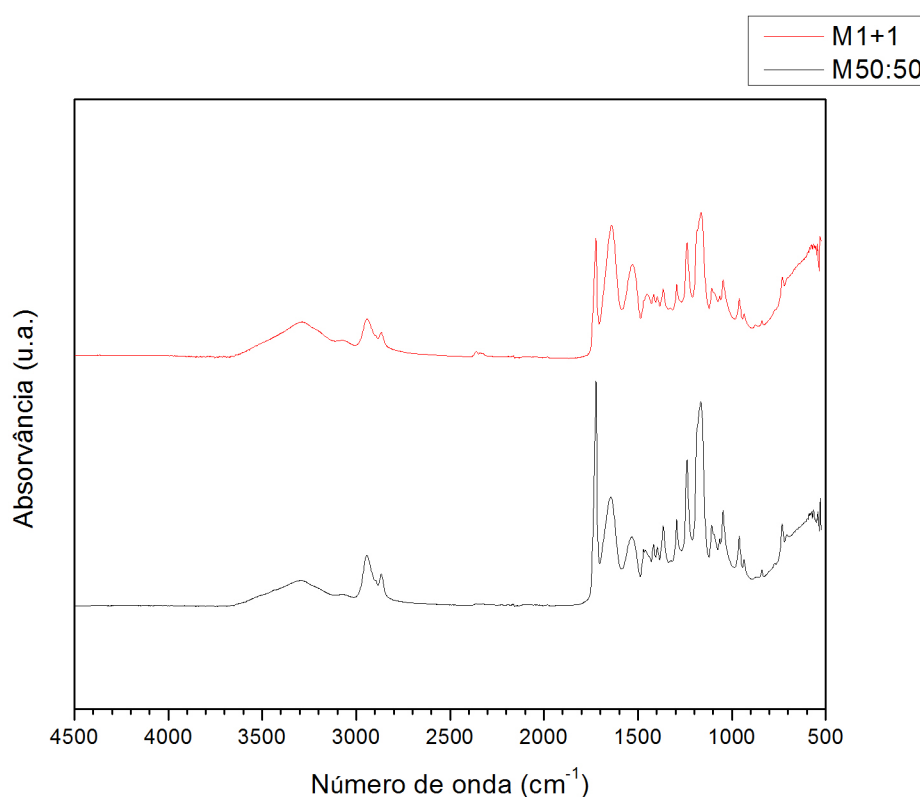


Figura 3.26: Espectro FTIR da matriz M50:50 e da matriz M1+1

Relativamente à matriz M1+1 (figura 3.26), seria de esperar um espectro idêntico ao da matriz M50:50, uma vez que a proporção de polímero em ambas as matrizes é igual. Contudo, verifica-se que os picos característicos do PCL em M1+1 são ligeiramente menos intensos que os de M50:50. Uma explicação para essa ocorrência, passa pelo facto da zona analisada pelo módulo ATR ser extremamente pequena. Na matriz M1+1, ambos os polímeros são fiados ao mesmo tempo, tornando-se impossível de controlar onde está a ser depositado cada tipo de fibra a cada instante. Como tal, é possível que a zona analisada seja uma zona específica da amostra onde tenham sido depositadas mais fibras de gelatina do que de PCL.

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

4

Conclusões e perspectivas

O tema da presente dissertação, *Produção e caracterização de uma matriz dérmica à base de nanofibras de gelatina e policaprolactona*, encontra-se inserido nas áreas dos Biomateriais e da Engenharia de Tecidos e teve como principal objectivo a produção de uma matriz porosa, biocompatível e biodegradável, que se destina a actuar como a componente dérmica de um substituto de pele.

Neste trabalho recorreu-se à técnica de electrofiação e à combinação de dois polímeros, a policaprolactona e a gelatina de peixe de água fria, de modo a obter um substituto dérmico de forma relativamente simples e de baixo custo. Foram produzidas seis matrizes diferentes: uma delas é composta por dois tipos de nanofibras de polímeros diferentes, enquanto que nas restantes cinco, as nanofibras das matrizes são constituídas pelos dois polímeros misturados em quantidades variáveis. Após a fiação, as matrizes são submetidas a um processo de reticulação de modo a diminuir a sua taxa de degradação e melhorar o desempenho termo-dinâmico das mesmas.

Uma vez que as matrizes são obtidas a partir de soluções poliméricas, as propriedades dessas soluções foram analisadas, verificando-se que a sua condutividade aumenta proporcionalmente à quantidade de gelatina, enquanto que a tensão superficial se mantém inalterada. O estudo do comportamento reológico destas soluções revelou que a viscosidade aumenta com a concentração de PCL. Estas soluções não apresentaram dificuldades na sua fiação.

CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A análise morfológica das matrizes obtidas revela fibras sem defeitos, cujo diâmetro na maioria das matrizes não sofre alterações significativas após o processo de reticulação, dando origem a matrizes com porosidades compreendidas entre os 55 e os 89%, valores semelhantes aos aconselhados na literatura para uma matriz dérmica. Contudo, a morfologia destas após o processo de lavagem a que foram sujeitas, revelou um certo grau de fusão das nanofibras, especialmente na matriz com maior proporção de gelatina.

Os ensaios de tracção realizados permitiram observar que, no geral, o aumento da quantidade de gelatina nas matrizes provoca uma diminuição das suas propriedades mecânicas, verificando-se ainda que a matriz com iguais quantidades de polímero em fibras separadas, apresenta melhores propriedades mecânicas do que a sua homóloga com a mesma porção de polímeros, mas apenas um tipo de fibra.

Destes ensaios, conclui-se que nenhuma das matrizes apresenta propriedades mecânicas equiparáveis às da pele. Contudo, estes testes foram efectuados em matrizes desidratadas, tendo-se verificado que assim que são hidratadas, as matrizes no geral revelam um aumento drástico de elasticidade e flexibilidade, fazendo prever que neste caso, as suas propriedades mecânicas já irão ao encontro das da pele. A quantificação destas alterações requer a realização de testes mecânicos com um aparelho que permita manter as amostras hidratadas.

As medições referentes à hidrofiliidade das matrizes revelaram que apenas uma delas, a matriz M90:10 oferece resistência à penetração de água no seu interior. Todas as restantes, revelaram uma excelente hidrofiliidade, característica útil nestas matrizes, uma vez que indicam potencial para uma boa adesão à pele.

Com a análise FTIR, foi confirmada a presença de ambos os polímeros em todas as matrizes produzidas, verificando-se ainda que o processo de reticulação não provoca alterações, a nível da sua composição química, capazes de influenciar negativamente a posterior adesão e proliferação celular.

Finda a caracterização das matrizes e com base nos resultados obtidos, não se pode excluir nenhuma delas como potencial candidata à componente dérmica de um substituto de pele.

Contudo, as matrizes com maior quantidade de gelatina e com maior quantidade de PCL, suscitam algumas dúvidas. A primeira, porque a elevada fusão de fibras após a lavagem faz prever que a sua taxa de degradação talvez seja demasiado rápida para a aplicação a que se destina. A segunda, porque apesar de flexível e elástica, apresenta uma hidrofobicidade que talvez seja incompatível com a sua posterior adesão à zona da pele que se pretenda regenerar.

CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

De forma a completar este trabalho, e ficar mais perto de descobrir quais destas matrizes possuem as qualidades necessárias para a sua integração no substituto de pele, seria necessário submete-las a testes de citotoxicidade e/ou testes de adesão e proliferação celular. Como valorização deste trabalho, está prevista a curto prazo a realização desses mesmos testes. Uma vez obtidos os resultados, será então possível aferir com mais certeza sobre a capacidade de regeneração da derme assistida por estas matrizes.

Terminada a caracterização a nível laboratorial, o passo seguinte na avaliação das matrizes seria a realização de ensaios *in vivo*. Nestes ensaios existiria a possibilidade de testar a resistência das matrizes ao manuseamento por parte do cirurgião, assim como avaliar a sua adesão à ferida. Macroscopicamente, seria possível avaliar o tempo de degradação/reabsorção das matrizes e verificar se evitam a contracção da ferida. A análise histológica permitiria avaliar a regeneração da derme promovida pelas matrizes a nível da formação de novo tecido, da sua vascularização e da reacção inflamatória gerada pela sua presença.

CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Bibliografia

- [1] J. Dangelo and C. Fattini, *Anatomia Humana Básica*. São Paulo: Atheneu, 2 ed., 2002.
- [2] E. J. Chong, T. T. Phan, I. J. Lim, Y. Z. Zhang, B. H. Bay, S. Ramakrishna, and C. T. Lim, “Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution,” *Acta Biomaterialia*, vol. 3, pp. 321–30, May 2007.
- [3] C. Pham, J. Greenwood, H. Cleland, P. Woodruff, and G. Maddern, “Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review,” *Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries*, vol. 33, pp. 946–57, Dec. 2007.
- [4] S. P. Zhong, Y. Z. Zhang, and C. T. Lim, “Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction,” *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 2, no. 5, pp. 510–25, 2010.
- [5] D. J. Wong, H. Y. Chang, and E. Biology, “Skin tissue engineering,” *StemBook*, pp. 1–9, 2009.
- [6] S. MacNeil, “Progress and opportunities for tissue-engineered skin,” *Nature*, vol. 445, pp. 874–80, Feb. 2007.
- [7] S. III and R. Tompkins, “Artificial Skin,” *Annu. Rev. Med.*, no. 3, pp. 231–244, 2000.
- [8] B. Zavan, V. Vindigni, R. Cortivo, and G. Abatangelo, “Skin Substitutes,” pp. 509–524.
- [9] D. Breitkreutz, N. Mirancea, and R. Nischt, “Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions?,” *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 132, pp. 1–10, July 2009.
- [10] M. Carvalho, A. Colaço, and Z. Fortes, “Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina,” *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, vol. 50, pp. 304–312, Apr. 2006.
- [11] B. P. Chan and K. W. Leong, “Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations,” *European Spine Journal : Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*, vol. 17 Suppl 4, pp. 467–79, Dec. 2008.

- [12] M. A. Woodruff and D. W. Hutmacher, "The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century," *Progress in Polymer Science*, vol. 35, pp. 1217–1256, Oct. 2010.
- [13] S. Yang, K. Leong, Z. Du, and C. Chua, "The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors," *Tissue engineering*, vol. 7, no. 6, pp. 679–689, 2001.
- [14] G. Chen, T. Ushida, and T. Tateishi, "Scaffold Design for Tissue Engineering," *Macromolecular Bioscience*, vol. 2, pp. 67–77, Feb. 2002.
- [15] R. V. Shevchenko, S. L. James, and S. E. James, "A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction.," *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, vol. 7, pp. 229–58, Feb. 2010.
- [16] D. J. Wainwright, "Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns.," *Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries*, vol. 21, pp. 243–8, June 1995.
- [17] T. Seyhan, "Split-Thickness Skin Grafts," *Intechopen.com*, pp. 3–17, 1977.
- [18] J. T. Shores, A. Gabriel, and S. Gupta, "Skin substitutes and alternatives: a review.," *Advances in Skin & Wound Care*, vol. 20, pp. 493–508; quiz 509–10, Sept. 2007.
- [19] P. L. Chern, C. L. Baum, and C. J. Arpey, "Biologic dressings: current applications and limitations in dermatologic surgery.," *Dermatologic Surgery : Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*, vol. 35, pp. 891–906, June 2009.
- [20] W. Haslik, L.-P. Kamolz, G. Nathschläger, H. Andel, G. Meissl, and M. Frey, "First experiences with the collagen-elastin matrix Matriderm as a dermal substitute in severe burn injuries of the hand.," *Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries*, vol. 33, pp. 364–8, May 2007.
- [21] S. Böttcher-Haberzeth, T. Biedermann, C. Schiestl, F. Hartmann-Fritsch, J. Schneider, E. Reichmann, and M. Meuli, "Matriderm® 1 mm versus Integra® Single Layer 1.3 mm for one-step closure of full thickness skin defects: a comparative experimental study in rats.," *Pediatric Surgery International*, vol. 28, pp. 171–7, Feb. 2012.
- [22] C. Wicke, A. Bachinger, S. Coerper, S. Beckert, M. B. Witte, and A. Königsrainer, "Aging influences wound healing in patients with chronic lower extremity wounds treated in a specialized Wound Care Center.," *Wound Repair and Regeneration : Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, vol. 17, no. 1, pp. 25–33.
- [23] A. Gosain and L. DiPietro, "Aging and wound healing.," *World Journal of Surgery*, vol. 28, pp. 321–6, Mar. 2004.

- [24] E. J. Chong, T. T. Phan, I. J. Lim, Y. Z. Zhang, B. H. Bay, S. Ramakrishna, and C. T. Lim, "Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution.," *Acta Biomaterialia*, vol. 3, pp. 321–30, May 2007.
- [25] D. Li and Y. Xia, "Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel?," *Advanced Materials*, vol. 16, pp. 1151–1170, July 2004.
- [26] J. Santos, J. P. Soares, and E. Dockal, "Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens," *Polimeros Ciencia*, vol. 13, pp. 242–249, 2003.
- [27] P. Arndt, D. Thomas, and U. Rosenthal, "Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone catalyzed by titanocene and zirconocene alkyne complexes," *Tetrahedron Letters*, vol. 38, no. 31, pp. 5467–5468, 1997.
- [28] a. Cipitria, a. Skelton, T. R. Dargaville, P. D. Dalton, and D. W. Hutmacher, "Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds - a review," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, no. 26, p. 9419, 2011.
- [29] A. Kanani, "Effect of changing solvents on poly (ϵ -caprolactone) nanofibrous webs morphology," *Journal of Nanomaterials*, 2011.
- [30] J. C. Middleton and a. J. Tipton, "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices.," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 2335–46, Dec. 2000.
- [31] Y. Zhang, H. Ouyang, C. T. Lim, S. Ramakrishna, and Z.-M. Huang, "Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds.," *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied biomaterials*, vol. 72, pp. 156–65, Jan. 2005.
- [32] W. T. Godbey and A. Atala, "In vitro systems for tissue engineering.," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 961, pp. 10–26, June 2002.
- [33] B. Alberts, A. Johnson, and K. Roberts, *Molecular biology of the cell*. Garland Science, 4 ed., 2002.
- [34] X. Hu, L. Ma, C. Wang, and C. Gao, "Gelatin hydrogel prepared by photo-initiated polymerization and loaded with TGF-beta1 for cartilage tissue engineering.," *Macromolecular Bioscience*, vol. 9, pp. 1194–201, Dec. 2009.
- [35] S.-C. Wu, W.-H. Chang, G.-C. Dong, K.-Y. Chen, Y.-S. Chen, and C.-H. Yao, "Cell adhesion and proliferation enhancement by gelatin nanofiber scaffolds," *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, vol. 26, pp. 565–577, Oct. 2011.
- [36] B.-S. Chiou, R. J. Avena-Bustillos, P. J. Bechtel, H. Jafri, R. Narayan, S. H. Imam, G. M. Glenn, and W. J. Orts, "Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties," *European Polymer Journal*, vol. 44, pp. 3748–3753, Nov. 2008.

- [37] M. S. Kim, I. Jun, Y. M. Shin, W. Jang, S. I. Kim, and H. Shin, "The development of genipin-crosslinked poly(caprolactone) (PCL)/gelatin nanofibers for tissue engineering applications.," *Macromolecular Bioscience*, vol. 10, pp. 91–100, Jan. 2010.
- [38] Y. Zhang, J. Venugopal, Z.-M. Huang, C. Lim, and S. Ramakrishna, "Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers," *Polymer*, vol. 47, pp. 2911–2917, Apr. 2006.
- [39] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, M.-H. Nasr-Esfahani, and S. Ramakrishna, "Electrospun poly(epsilon-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering.," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 4532–9, Dec. 2008.
- [40] R. Tigli, N. Kazaroglu, and M. Mavis, and Gumusderel, "Cellular Behavior on Epidermal Growth Factor (EGF)-Immobilized PCL/Gelatin Nanofibrous Scaffolds.," *Journal of Biomaterials Science. Polymer edition*, vol. 22, pp. 207–223, June 2010.
- [41] S. Ramakrishna, *An introduction to electrospinning and nanofibers*. World Scientific Publishing, 2005.
- [42] C. Herkenne, I. Alberti, A. Naik, Y. N. Kalia, F.-X. Mathy, V. Pr  at, and R. H. Guy, "In vivo methods for the assessment of topical drug bioavailability.," *Pharmaceutical Research*, vol. 25, pp. 87–103, Jan. 2008.
- [43] P. Songchotikunpan, J. Tattiyakul, and P. Supaphol, "Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin.," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 42, pp. 247–55, Apr. 2008.
- [44] E. J. Chong, T. T. Phan, I. J. Lim, Y. Z. Zhang, B. H. Bay, S. Ramakrishna, and C. T. Lim, "Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution.," *Acta Biomaterialia*, vol. 3, pp. 321–30, May 2007.
- [45] S. Zhang, Y. Huang, X. Yang, F. Mei, Q. Ma, G. Chen, S. Ryu, and X. Deng, "Gelatin nanofibrous membrane fabricated by electrospinning of aqueous gelatin solution for guided tissue regeneration.," *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, vol. 90, pp. 671–9, Sept. 2009.
- [46] A. Annaidh, M. Ottenio, and K. Bruy  re, "Mechanical Properties of Excised Human Skin," *6th World Congress of Dermatology*, pp. 2–5, 2010.
- [47] X. Li, J. Xie, X. Yuan, and Y. Xia, "Coating electrospun poly(epsilon-caprolactone) fibers with gelatin and calcium phosphate and their use as biomimetic scaffolds for bone tissue engineering.," *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, vol. 24, pp. 14145–50, Dec. 2008.
- [48] Y. C. Lim, J. Johnson, Z. Fei, Y. Wu, D. F. Farson, J. J. Lannutti, H. W. Choi, and L. J. Lee, "Micropatterning and characterization of electrospun poly( -caprolactone)/gelatin

- nanofiber tissue scaffolds by femtosecond laser ablation for tissue engineering applications,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 108, pp. 116–26, Jan. 2011.
- [49] M. Gümüşderelioglu and R. Tigli, “A novel dermal substitute based on biofunctionalized electrospun PCL nanofibrous matrix,” *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, vol. 98, pp. 461–72, Sept. 2011.
- [50] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, M. H. Nasr-Esfahani, and S. Ramakrishna, “Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 30, pp. 1129–1136, Oct. 2010.
- [51] N. Filipovic and M. Stevanovic, “Facile synthesis of poly (ϵ -caprolactone) micro and nanospheres using different types of polyelectrolytes as stabilizers under ambient and elevated temperature,” *Composites Part B*, 2012.
- [52] A. Elzubair, C. N. Elias, J. a. C. M. Suarez, H. P. Lopes, and M. V. B. Vieira, “The physical characterization of a thermoplastic polymer for endodontic obturation,” *Journal of Dentistry*, vol. 34, pp. 784–9, Nov. 2006.
- [53] T. Elzein, M. Nasser-Eddine, C. Delaite, S. Bistac, and P. Dumas, “FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 273, pp. 381–7, May 2004.
- [54] V. K. Khatiwala, N. Shekhar, S. Aggarwal, and U. K. Mandal, “Biodegradation of Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) Film by *Alcaligenes faecalis*,” *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 16, pp. 61–67, May 2008.
- [55] S. H. Barbanti, C. A. C. Zavaglia, and E. A. R. Duek, “Degradação Acelerada de Suportes de Poli(ϵ -Caprolactona) e Poli(D,L-Ácido Láctico-co-Ácido Glicólico) em Meio Alcalino,” *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 16, no. 2, pp. 141–148, 2006.
- [56] Z. Nur Hanani, Y. Roos, and J. P. Kerry, “Use of beef, pork and fish gelatin sources in the manufacture of films and assessment of their composition and mechanical properties,” *Food Hydrocolloids*, vol. 29, pp. 144–151, Oct. 2012.
- [57] K. D. Wael and A. Verstraete, “The electrochemistry of a gelatin modified gold electrode,” *Electrochemical*, vol. 6, pp. 1810–1819, 2011.
- [58] A. R. Chandrasekaran, J. Venugopal, S. Sundarrajan, and S. Ramakrishna, “Fabrication of a nanofibrous scaffold with improved bioactivity for culture of human dermal fibroblasts for skin regeneration,” *Biomedical Materials (Bristol, England)*, vol. 6, p. 015001, Feb. 2011.
- [59] C. S. Ki, D. H. Baek, K. D. Gang, K. H. Lee, I. C. Um, and Y. H. Park, “Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution,” *Polymer*, vol. 46, pp. 5094–5102, June 2005.

- [60] S. Mobini, J. Javadpour, M. Hosseinalipour, M. Ghazi-Khansari, a. Khavandi, and H. R. Rezaie, "Synthesis and characterisation of gelatine-nano hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering," *Advances in Applied Ceramics*, vol. 107, pp. 4–8, Feb. 2008.
- [61] U. Venkateswarlu, K. Boopalan, R. Mohan, B. N. Das, and T. P. Sastry, "Studies on chemically modified hen egg white and gelatin composites," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 100, pp. 318–322, Apr. 2006.
- [62] B. Li, J. Kennedy, Q. Jiang, and B. Xie, "Quick dissolvable, edible and heatsealable blend films based on konjac glucomannan-Gelatin," *Food Research International*, vol. 39, pp. 544–549, June 2006.
- [63] M. C. Chang and J. Tanaka, "FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde.," *Biomaterials*, vol. 23, pp. 4811–8, Dec. 2002.

Apêndice - Acompanhamento dos ensaios *in vivo*

Uma matriz que seja produzida com o objectivo de estimular a regeneração de um determinado órgão ou tecido, necessita de ter as suas características físicas, químicas e bioquímicas testadas a nível laboratorial, de modo a ser avaliado o seu potencial na promoção da regeneração. Uma vez terminado esse processo, a fase seguinte da avaliação dessa matriz é a sua implantação *in vivo*. Nesta etapa, é dada aos investigadores a oportunidade de validarem os resultados obtidos em laboratório.

Os ensaios *in vivo* tiveram lugar no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade Nova de Lisboa, sob a supervisão da Doutora Maria Angélica Roberto. Nestes ensaios, as cobaias utilizadas foram ratos Wistar.

Preparação das matrizes

As matrizes foram produzidas pela Mestre Susana Gomes e, durante o meu acompanhamento dos ensaios, foram implantados três tipos diferentes de matrizes, feitas a partir de três polímeros distintos, respectivamente: a policaprolactona (PCL), a gelatina de peixe de água fria e o quitosano. A produção destas matrizes foi feita recorrendo à técnica de electrofiação. As matrizes, com uma espessura de cerca de $200\mu\text{m}$, foram cortadas em quadrados de $2\text{cm}\times 2\text{cm}$ e colocadas numa placa de poços, de um dia para o outro, com 4 ml de uma solução etanol a 70%, de modo a proceder à sua desinfecção. Uma vez que esta dissertação incidiu apenas sobre o PCL e a gelatina, doravante a descrição dos ensaios será apenas das matrizes feitas a partir destes dois polímeros.

Colocação das matrizes

Já no biotério, e previamente à implantação de cada matriz, o rato Wistar é anestesiado com uma mistura de ketamina:diazepam, na proporção de 2:1. Enquanto se espera pelo efeito da anestesia, os animais são sujeitos a uma tricotomia (remoção do pêlo) na zona a ser implantada, sendo essa zona de seguida pulverizada com um anti-séptico em spray.

Uma vez sob o efeito da anestesia e recorrendo a um bisturi, é retirado do rato um retalho de pele com a dimensão da matriz ($2\text{cm}\times 2\text{cm}$). A remoção do retalho é feita de modo a que este contenha a epiderme e a derme, por forma a simular uma queimadura ou ferida

com destruição significativa dos tecidos. Após a remoção, a pele à volta da ferida é suturada ao plano profundo. Este processo tem como objectivo retardar a contracção da ferida, que é um processo extremamente eficaz de resolução de feridas em roedores e dificulta a análise do papel desempenhado pela matriz.

A matriz é então colocada no local de onde foi retirado o retalho. No caso das matrizes de gelatina, a adesão à ferida foi imediata (figura 1(b)), como tal não foi necessário suturá-la, sendo simplesmente coberta com gaze esterilizada. As matrizes de PCL não aderiram à ferida da mesma maneira, como tal, as suas extremidades foram suturadas ao plano profundo de modo a mantê-la no local desejado (figura 1(a)), sendo também coberta com gaze. Em ambos os tipos de matrizes, essa gaze é agramada à pele de maneira a evitar o contacto da ferida com os detritos existentes na gaiola, onde o roedor é guardado.

Aliado a cada matriz, é também feito um controlo. O controlo consiste numa zona onde é também removido um retalho de pele sendo as extremidades da ferida resultante também suturadas ao plano profundo. Contudo, em vez de ser colocada uma matriz, é simplesmente colocada gaze esterilizada embebida em vaselina, que por sua vez é agramada à pele. Este controlo tem como objectivo comparar a evolução da regeneração da pele com e sem matriz.

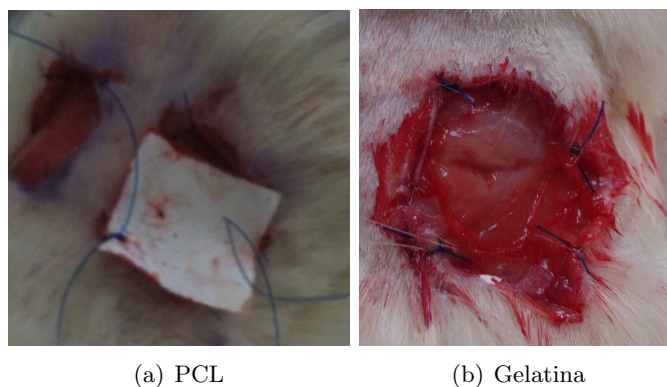


Figura 1: Matrizes após a sua aplicação *in vivo*

Remoção das matrizes

Cada tipo de matriz é implantado em triplicado, com vista a serem removidas para análise histológica em três tempos diferentes, ao fim de 7, 14 e 28 dias. Após essa remoção, as biópsias são conservadas em folmaldeído até serem realizadas análises histológicas. Os controlos também são sujeitos a este processo.

Devido ao seu tamanho, cada roedor apenas pode ser sujeito a dois implantes, ambos na zona lombar. Na remoção da zona onde foi feito o primeiro implante, a ferida resultante é suturada e a regeneração da pele na zona do segundo implante é estudada até ao tempo seguinte de remoção. Os animais em estudo não podem ser posteriormente usados em mais ensaios. Logo, aquando da remoção da zona do segundo implante, o rato é previamente

eutanasiado (por asfixia numa atmosfera saturada com dióxido de carbono), pelo que já não é necessária anestesia, nem a sutura final da ferida. Após essa remoção, o animal é catalogado e posteriormente incinerado.